

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Frauenkrankheiten
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Cytophotometrische Untersuchungen
zum Nachweis der schwefelhaltigen Aminosäuren
Cystein/Cystin im Zellkern von Carcinomata
in situ und Plattenepithelkarzinomen der
menschlichen Portio uteri**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Annette Christine Queißer

aus Mainz

Mainz 1980

Aus der Klinik für Geburtshilfe und Frauenkrankheiten
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Cytophotometrische Untersuchungen
zum Nachweis der schwefelhaltigen Aminosäuren
Cystein/Cystin im Zellkern von Carcinomata
in situ und Plattenepithelkarzinomen der
menschlichen Portio uteri**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von

Annette Christine Queißer

aus Mainz

Mainz 1980



Dekan: Professor Dr. med. H. Leithoff

1. Gutachter: Professor Dr. med. V. Friedberg

2. Gutachter: Professor Dr. med. G. Rathgen

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1980

INHALTSVERZEICHNIS

INHALT

1. Einleitung	1
2. Zielsetzung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse	4
5. Diskussion	5
6. Zusammenfassung	6
7. Literaturverzeichnis	7
8. Anhang	8
9. Glossar	9
10. Index	10
11. Bibliographie	11
12. Quellenverzeichnis	12
13. Literaturverzeichnis	13
14. Quellenverzeichnis	14
15. Literaturverzeichnis	15
16. Quellenverzeichnis	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Quellenverzeichnis	18
19. Literaturverzeichnis	19
20. Quellenverzeichnis	20
21. Literaturverzeichnis	21
22. Quellenverzeichnis	22
23. Literaturverzeichnis	23
24. Quellenverzeichnis	24
25. Literaturverzeichnis	25
26. Quellenverzeichnis	26
27. Literaturverzeichnis	27
28. Quellenverzeichnis	28
29. Literaturverzeichnis	29
30. Quellenverzeichnis	30
31. Literaturverzeichnis	31
32. Quellenverzeichnis	32
33. Literaturverzeichnis	33
34. Quellenverzeichnis	34
35. Literaturverzeichnis	35
36. Quellenverzeichnis	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Quellenverzeichnis	38
39. Literaturverzeichnis	39
40. Quellenverzeichnis	40
41. Literaturverzeichnis	41
42. Quellenverzeichnis	42
43. Literaturverzeichnis	43
44. Quellenverzeichnis	44
45. Literaturverzeichnis	45
46. Quellenverzeichnis	46
47. Literaturverzeichnis	47
48. Quellenverzeichnis	48
49. Literaturverzeichnis	49
50. Quellenverzeichnis	50
51. Literaturverzeichnis	51
52. Quellenverzeichnis	52
53. Literaturverzeichnis	53
54. Quellenverzeichnis	54
55. Literaturverzeichnis	55
56. Quellenverzeichnis	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Quellenverzeichnis	58
59. Literaturverzeichnis	59
60. Quellenverzeichnis	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Quellenverzeichnis	62
63. Literaturverzeichnis	63
64. Quellenverzeichnis	64
65. Literaturverzeichnis	65
66. Quellenverzeichnis	66
67. Literaturverzeichnis	67
68. Quellenverzeichnis	68
69. Literaturverzeichnis	69
70. Quellenverzeichnis	70
71. Literaturverzeichnis	71
72. Quellenverzeichnis	72
73. Literaturverzeichnis	73
74. Quellenverzeichnis	74
75. Literaturverzeichnis	75
76. Quellenverzeichnis	76
77. Literaturverzeichnis	77
78. Quellenverzeichnis	78
79. Literaturverzeichnis	79
80. Quellenverzeichnis	80
81. Literaturverzeichnis	81
82. Quellenverzeichnis	82
83. Literaturverzeichnis	83
84. Quellenverzeichnis	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Quellenverzeichnis	86
87. Literaturverzeichnis	87
88. Quellenverzeichnis	88
89. Literaturverzeichnis	89
90. Quellenverzeichnis	90
91. Literaturverzeichnis	91
92. Quellenverzeichnis	92
93. Literaturverzeichnis	93
94. Quellenverzeichnis	94
95. Literaturverzeichnis	95
96. Quellenverzeichnis	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Quellenverzeichnis	98
99. Literaturverzeichnis	99
100. Quellenverzeichnis	100

Meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
METHODE	5
a. Allgemeine Bemerkungen zur Methode der Cytophotometrie	5
b. Allgemeine Bemerkungen zur Alcianblau-Färbung	7
c. Allgemeine Bemerkungen zur Feulgen-Acriflavin-Färbung	13
MATERIAL und ARBEITSVORSCHRIFTEN	15
a. Material -- Patientengut	15
b. Präparation	17
c. Meßinstrument	20
d. Messungen am Cytophotometer	22
ERGEBNISSE	25
a. Nachweis der semiquantitativen Vergleichbarkeit der Färbemethoden	25
b. Feulgen-Acriflavin-Färbung zum Nachweis der DNA im Zellkern	29
c. Alcianblau-Färbung zum Nachweis des Cysteins/Cystins im Zellkern	33
d. Statistische Analyse	37
DISKUSSION	42
ZUSAMMENFASSUNG	49
LITERATURVERZEICHNIS	51
DANKSAGUNG	
LEBENS LAUF	

EINLEITUNG

Vor 100 Jahren legte Friedrich Miescher mit seinen Arbeiten über die "Nukleinstoffe" den wesentlichen Grundstein für die Erforschung der Nukleinsäurenstruktur. Er teilte diese Nukleinstoffe in zwei Gruppen ein und bezeichnete die eine Fraktion als lösliches Nuklein (Desoxyribonukleinsäure), die andere Fraktion als Protamine (seit Kossel 1928: Histone) (LUCK, 1964).

CASPERSSON (1936) fand eine Methode, die es ermöglichte, eine Aussage über die Menge an Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Zellkern zu treffen. Dieses Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Kernstrukturen der Zelle beruht auf einer Absorptionsbande des DNA-Proteinkomplexes im ultravioletten Licht und auf photometrischer Messung. Die Weiterentwicklung dieser Technik, im Zusammenhang mit der Verwendung histochemischer Farbstoffe, erlaubt, genauere Angaben über die Zusammensetzung der Kernbestandteile zu treffen (SWIFT, 1950; CASPERSSON et al., 1960). Die Zytologie, die sich speziell mit dem strukturellen Aufbau der Einzelzelle beschäftigt, erreichte, im Rahmen der klinischen Anwendung, durch die von PAPANICOLAOU und TRAUT (1943) eingeführte Screening Methode zum Nachweis von Zellveränderungen beim Uteruskarzinom (wie Anisocytose, Heterochromasie, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation) große Bedeutung.

In allen normalen, im Ruhezustand des Zellzyklus befindlichen Körperzellen derselben Art ist der DNA-Gehalt gleich groß (Gesetz von der DNA-Konstanz) (VENDRELEY und VENDRELEY, 1948 und 1949; MIRSKY und RIS, 1949). Im Vergleich zur Normalzelle läßt sich in Tumorzellen ein atypisches Verteilungsmuster

der DNA nachweisen, das mit den atypischen Chromosomensätzen des Tumors in Einklang steht. Jeder Tumor weist eine spezifische Chromosomenzahl (Chromosomenstammlinie) und damit auch eine spezifische DNA-Stammlinie auf. Die Stammlinie eines Tumors variiert innerhalb gewisser Regeln, wobei hyperdiploide, hypertetraploide und hyperoktoploide Chromosomensätze bzw. DNA-Werte auftreten können (SANDRITTER und FISCHER, 1962; SANDRITTER, 1965). Im Rahmen eines malignen Wachstumsprozesses findet eine Verschiebung des Verhältnisses Euchromatin (aktives Chromatin): Heterochromatin (inaktives Chromatin) zugunsten des Letzteren statt (GRUNDMANN und STEIN, 1961; SANDRITTER, 1970). Die im Zellkern enthaltenen basischen und sauren Kernproteine verhalten sich weitgehend analog. Eine enge Korrelation zwischen Histon und Nichthistonproteinen ist anzunehmen, und dies ist als große Synchronie von DNA- und Kernproteinvermehrung zu deuten (LEDERER, 1966).

Den Histonen (basische Kernproteine) wird durch die Tatsache, daß sie zusammen mit der DNA eine strukturelle Einheit bilden, im Hinblick auf die Chromatinstruktur eine ganz besondere Rolle zugeschrieben. Histone sind für die Aufschraubung der Chromatinfibrille verantwortlich (SADGOPAL und BONNER, 1970; ALLFREY, 1971; KORNBERG und THOMAS, 1974; SOLLNER-WEBB und FELSENFELD, 1975; FRANKLIN und ZWEIDLER, 1977).

Man unterteilt die Histone in fünf Unterfraktionen (H1, H2a, H2b, H3 und H4 oder nach anderer Nomenklatur F1, F2a1, F2a2, F2b und F3). Lediglich die Fraktion F3 enthält die Aminosäuren Cystein/Cystin (BLAZSEK und BUKARESTI, 1964; PHILLIPPS, 1965; ALLFREY, 1971; HNILICA, 1972). Da das Monemere Cystein mit seiner Thiolgruppe (SH-Gruppe) durch Oxydation (bzw. Autoxydation) sehr leicht - sogar im Peptidverband der lebenden

Zelle - in seine dimere Form Cystin übergeht, ist eine genaue Differenzierung zwischen diesen beiden Aminosäuren im Zusammenhang dieser Arbeit nicht möglich (PANYIM und CHALKLEY, 1969; PANYIM et al., 1971). Cystein wird auch als Halbmolekül des Cystins bezeichnet (RAUEN, 1964). Cystein ist eine für den Aufbau der Chromatinfibrille sehr wichtige Aminosäure, da die wesentlichste Hauptvalenzbindung zwischen den Seitenketten der Aminosäuren die Disulfidbindung ist, die sich zwischen zwei Cysteinresten durch Dehydrierung der SH-Gruppen ausgebildet (KARLSON, 1974). Die Disulfidbrücken (SS-Brücken) haben erheblichen Einfluß auf die Formkonstanz und die Stabilität eines Proteins. Cystin kann entweder als Diamino-Dicarbonsäure zwei Polypeptidketten angehören oder die Disulfidbindungen des Cystins können innerhalb einer einzigen Polypeptidkette auftreten (BUDDECKE, 1974). Beim Aufbau der Chromatinfibrille spielen die durch Cystein/Cystin anwesenden SS-Gruppen bzw. SH-Gruppen sowohl durch ihre Präsenz in der Histonfraktion F3 als auch durch die Verknüpfung der Residualproteine mit der DNA-Histon-Fibrille eine wesentliche Rolle (SADGOPAL und BONNER, 1970; MARQUARDT, 1971; KORNBERG, 1974).

Die Histone sind sehr eng mit der DNA-Doppelhelix verknüpft und stellen gemeinsam die Grundstruktur der Chromatinfibrille dar, die sowohl im Rahmen der Kanzerisierung als auch im Rahmen der Heterochromatisierung erhalten bleibt (SANDRITTER, 1970; PALOTTA et al., 1970). Nach diesen Erkenntnissen wurde es notwendig abzuklären, ob es bei malignem Wachstum zu Änderungen des prozentualen Anteils der einzelnen Aminosäuren im Zellkern kommt. HERZOG (1977) hat in diesem Zusammenhang nachgewiesen, daß bei der

Karzinogenese der menschlichen Portio uteri keine Unterschiede --- bezüglich des Lysin-, Arginin-, Gesamthistongehaltes in Relation zum DNA-Gehalt --- zwischen der normalen, der dysplastischen und der Karzinomzelle bestehen.

Durch diese Arbeit soll geklärt werden, ob im Zusammenhang mit malignen Wachstumsprozessen das Verhältnis von DNA zu Cystein/Cystin im Zellkern konstant bleibt, oder ob sich möglicherweise durch die Verschiebung dieser Relation ein Hinweis auf eine Änderung der Chromatinfibrille ergibt.

METHODE

a. Allgemeine Bemerkungen zur Methode der Cytophotometrie

Die Cytophotometrie, deren Erstbeschreiber CASPERSSON (1936) war, ist eine semiquantitative, histochemische Methode. Durch dieses Verfahren wurde es möglich, die Verteilung einer speziellen chemischen Komponente im Zellkern und in dessen Strukturen zu untersuchen. Diese Methodik dient der Messung der Konzentration, der Menge sowie des qualitativen Charakters bestimmter Substanzen innerhalb der Einzelzelle (SANDRITTER, 1961). Voraussetzung für die Auswertung der cytophotometrischen Messung ist die genaue Definition der zu messenden Zelle (STUTTE und KIKUCHI, 1969). Da jeweils nur eine Zelle gemessen wird, erhält man einen genauen und für jede Zelle im einzelnen bestimmbaren qualitativen und quantitativen Nachweis bestimmter Zellbestandteile. Das Prinzip der cytophotometrischen Messung gründet darauf, die Lichtdurchlässigkeit einer in den Zellen vorhandenen Substanz - entweder im nativen Zustand oder nach Einführung chromophober Gruppen - mit einem Photometer zu messen (BÜHM, 1965).

Abb. 1: Vereinfachte Skizze zum Schema der mikrophotometrischen
S. 6 Apparat

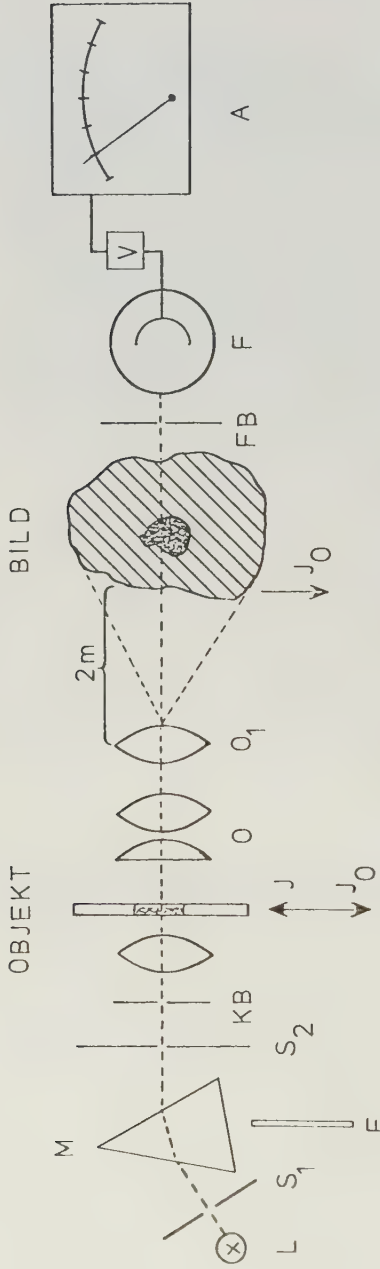


Abb.1 PRINZIP DER MIKROPHOTOMETRIE NACH CASPERSSON (1950):

L=Lichtquelle, S₁=Eintrittsspalt, S₂=Austrittsspalt des Monochromators, M=Monochromator, F=Filter, J₀=Leerstelle im histologischen Präparat, J=Meßstelle im Präparat, KB=Kondensorblende, O=Objektiv, O₁=Okular, FB=Photometerblende, F=Fotozelle bzw. SEV, V=Verstärker, A=Anzeigelinstrument (Böhm, 1965)

b. Allgemeine Bemerkungen zur Alcianblau-Färbung

Der basische Farbstoff Alcianblau wird, wie aus der entsprechenden Literatur bekannt ist, zum Nachweis der schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein/Cystin benutzt (ADAMS und SLOPER, 1956; ROMEIS, 1968).

Alcianblau, das wasserlösliche Kupferphthalocyanin, ist ein quartäres Methyl-p-Toluol-Sulfonat vom Kupfer-tetra-4-pyridylphthalocyanin (GOLDSTEIN, 1961; VILLEGAS et al., 1963; RÖMPP, 1974). Die Eigenfarbe dieser ungewöhnlich beständigen Schwermetallphthalocyanine ist kräftig blau (ULLMANN, 1962). Alcianblau, unfähig basische Proteine zu färben, wird zur Darstellung saurer Gewebsbestandteile verwandt (LANGE, 1966).

Der Ablauf der Alcianblau-Reaktion ist vom chemischen Standpunkt aus noch nicht genau geklärt. Die von ADAMS und SLOPER (1956) entwickelte Technik, ermöglicht die Darstellung von SS-Gruppen bzw. Cystein/Cystin durch Oxydation dieser Substanzen mit Perameisensäure, wobei die aus der Reaktion resultierende Cysteinsäure mit einer basischen Färbung (Alcianblau) bei einem pH von 0,2 demonstriert wird. Entscheidende Voraussetzung für die Spezifität dieser Färbung ist, daß die ausgesprochen sauren Substanzen schon bei diesem geringen pH-Wert in ionisierter Form vorliegen. Oxydierende Agentien, wie zum Beispiel Perameisensäure oder Peressigsäure, reagieren bevorzugt mit den Disulfidbrücken des Cystins.

Abb. 2: Strukturformel des basischen Farbstoffes
S. 8 Alcianblau (Kupferphthalocyanin)

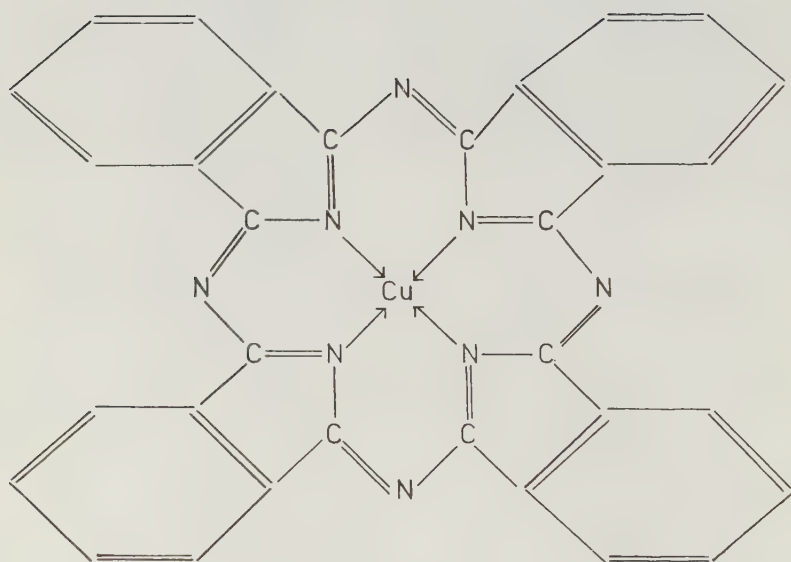


Abb.2 ALCIANBLAU (KUPFERPHTHALOCYANIN)
(Ullmann, 1962)

Durch vergleichende Versuche wurde gezeigt, daß es möglich ist, innerhalb einer Stunde - abgesehen von quantitativ vernachlässigbaren Mengen - den gesamten Cystingehalt zu oxydieren (ALEXANDER et al., 1950; LANGE, 1966).

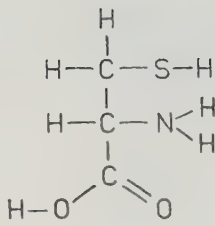
Die durch Oxydation der SH- oder SS-Gruppen entstandenen Säuren sind für den Anstieg der Basophilie verantwortlich, wobei sich die SS-Brücken des Cystins als besonders reaktionsfreudig erweisen. Bei der Oxydation dieser Gruppen entsteht hauptsächlich Cysteinsäure (PEARSE, 1951).

Dem histochemischen Nachweis - ADAMS und SLOPER (1956) - für Cystin liegt nicht die Reduktion des Cystins zur Bildung von Sulfhydrylgruppen zugrunde, sondern die Oxydation dieser Aminosäure, wodurch Cystein-Sulfon-Säuren entstehen. Die Sulfonate sind stark ionisierte Säureradikale, die durch einen basischen Farbstoff (z.B. Alcianblau) bei einem pH von 0,2 sichtbar gemacht werden können. Die Fähigkeit, im Bereich unter pH4 basische Farbstoffe zu binden, kann als Zeichen für das Vorliegen von Schwefelsäuregruppen gewertet werden (ROMEIS, 1968).

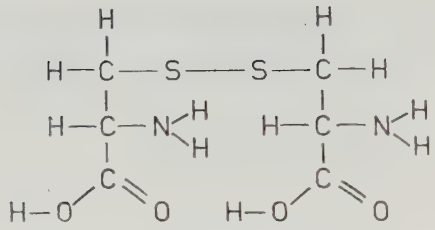
Der Oxydationvorgang wird von ADAMS und SLOPER (1956) in der in Abbildung 3 und Abbildung 4 angegebenen Weise dargestellt.

Abb. 3: Strukturformeln und Summenformeln der Aminosäuren
S. 10 Cystein (monomere Form) und Cystin (dimere Form)

Abb. 4: Oxydation der Aminosäure Cystin durch Perameisen-
S. 10 säure zur färberisch darstellbaren Cysteinsäure



L-CYSTEIN



L-CYSTIN

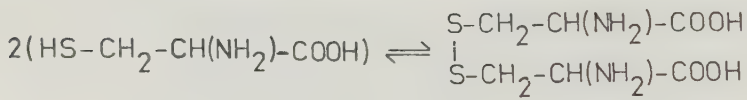
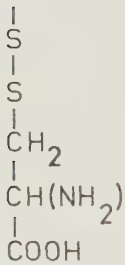


Abb. 3



+

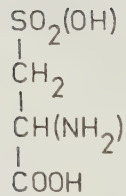


Abb. 4

In der Histochemie wird der stark kationische Farbstoff Alcianblau verwandt, um die Sulfatradikale der sauren Mukopolysaccharide darzustellen. Die basischen Eigenschaften, die von den hochionisierten Schwefel-, Isothiouronium- oder Pyrridoniumgruppen herühren, werden benutzt, um die durch Oxydation des Cysteins/Cystins entstandenen Sulfonatradi-kale zu demonstrieren. Die Spezifität dieser Methode für die Aminosäuren Cystein/Cystin wird von den Verfassern eindeutig dargelegt. Sie beweisen, daß bei der Oxydation eine starke Säure entsteht - Cysteinsäure genannt -, deren Radikale (Sulfonatradi-kale) in hochionisierter Form vorliegen (ADAMS und SLOPER, 1956). Die Säure ist selbst bei einem pH-Wert von 0,2 stark ionisiert. Dieser extrem niedrige pH-Wert von 0,2 entspricht genau dem pH-Wert der Alcianblaulösung. Schwache Säuregruppen, wie zum Beispiel die Carboxylatradikale der Aminosäuren, findet man bei diesem pH-Wert abgesehen von quantitativ vernachlässigbaren Mengen - nicht in ionisierter Form. Die einzigen Substanzen, so ADAMS und SLOPER, die in den ihnen vorliegenden Geweben fähig waren, mit Alcianblau bei einem pH-Wert von 0,2 zu reagieren, waren die Sulfonatradi-kale.

Die von den beiden Autoren eingeführte Standardmethode liegt auch dieser Arbeit zugrunde, wenn auch in etwas modifizierter Form. Durch die angegebene Vorbehandlung mit Perameisensäure war in den Präparaten eine Sprengung der Zellkernmembran zu beobachten. Die Meßobjekte waren somit für die Messung im Mikroskopcytophotometer nicht mehr verwendbar.

Da sämtliche färberischen Darstellungen der SS- bzw. der SH-Gruppen auf den oxydierenden Eigenschaften eines Reagenzes bei niedrigem pH-Wert basieren (BARNETT und SELIGMAN (1954)), wurde besonderer Wert auf die Einhaltung des extrem niedrigen pH-Wertes der Alcianblau-Lösung von 0,2 gelegt. Eine Selektion im Hinblick auf das Vorhandensein von Sulfatradikalen ist damit schon gegeben (ADAMS und SLOPER, 1956; ROMEIS, 1968).

Da bei unbeschädigten Zellkernen der beschriebene Färbefeffekt eingetreten ist, muß davon ausgegangen werden, daß eine Oxydation stattgefunden hat. Es ist anzunehmen, daß die in der Farbstofflösung vorhandene 2n Schwefelsäure dabei als Oxydationsmittel fungiert hat. Konzentrierte Schwefelsäure wird als Oxydationsmittel verwandt, da sie - in Umkehr der reduzierenden Wirkung der H_2SO_3 - das Bestreben hat, in schwefelige Säure überzugehen. Mit zunehmender Konzentrierung wächst das Oxydationsvermögen der Schwefelsäure (HOLLEMAN-WIBERG, 1971).

Die Möglichkeit, auf die Oxydationswirkung von Persäuren verzichten zu können, wurde durch LANGE (1966) bestätigt. LANGE hat die sich im Sammelrohr der Niere befindlichen sauren Gewesbestandteile (Mucine) mit Alcianblau färberisch dargestellt, ohne eine Vorbehandlung der Präparate mit Perameisensäure oder einem anderen Oxydationsmittel durchzuführen. Der Autor weist darauf hin, daß eine unterschiedliche Färbedauer keinen Einfluß auf die Intensität der Anfärbung und auf die Art der angefärbten Strukturen hat.

c. Allgemeine Bemerkungen zur Feulgen-Acriflavin-Färbung

Die spezifische Farbreaktion der DNA mit dem Schiffschens Reagenz ist 1924 von Feulgen als qualitativer Nachweis für Thymonukleinsäuren gefunden worden. WIDSTRÖM (1928) und CASPERSSON (1932) zeigten, daß diese Reaktion unter genauer Einhaltung der Versuchsbedingungen auch zur quantitativen Bestimmung der DNA im Zellkern geeignet ist. Inzwischen gilt die Feulgenreaktion als Standardmethode zum quantitativen Nachweis der DNA in Zellen. Die chemischen Vorgänge der Reaktion der fuchsin-schwefligen Säure (Schiffsches Reagenz) bei einem Überschuß von SO_2 werden in den Arbeiten von WIELAND und SCHEUING (1921) und KASTEN (1960) sehr klar und ausführlich dargestellt. Auf die genaue Darlegung des chemischen Ablaufs der Färbung wird aus diesem Grunde verzichtet. Die von GRAUMANN (1953) und SANDRITTER (1965) angegebene Färbetechnik wird im Rahmen dieser Arbeit ohne jegliche Modifikation verwandt.

Abb. 5: Strukturformeln zur Feulgen-Acriflavin-Färbung
S. 14

Abb. 5a: Strukturformel des Schiffschens Reagenz

Abb. 5b: Strukturformel des Farbstoffes Acriflavin

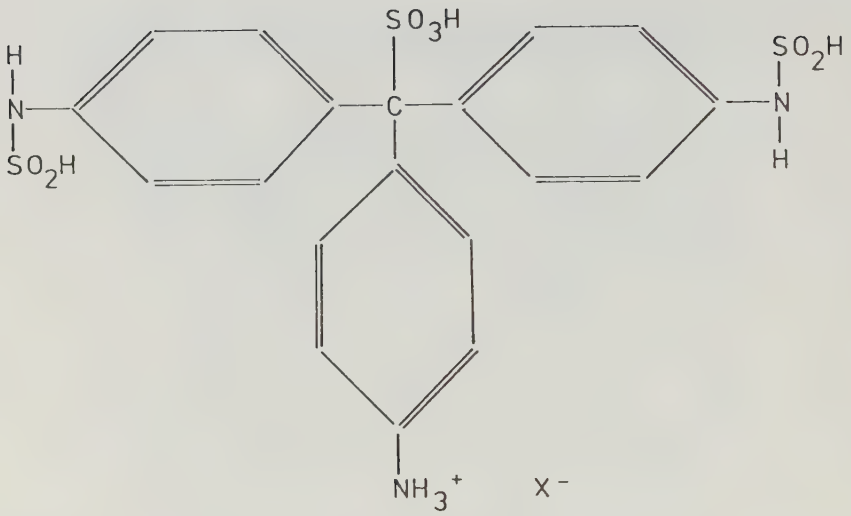


Abb. 5a SCHIFF'SCHES REAGENZ

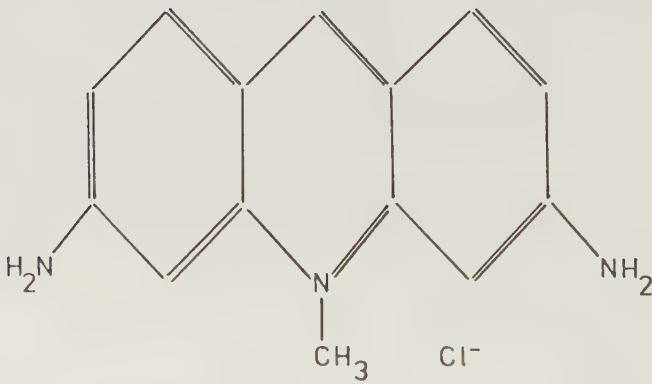


Abb. 5b ACRIFLAVIN

MATERIAL und ARBEITSVORSCHRIFTEN

a. Material -- Patientengut

Untersucht wurden menschliche Zellen von Smears der Portiooberfläche, menschliche Spermien und Kalbsthymus-lymphocyten. Die an Patientinnen der Universitäts-Frauenklinik Mainz durchgeführten Abstriche wurden entweder im Rahmen der gynäkologischen Krebsvorsorge oder stationär entnommen. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, wurden die durch Bakterien, Trichomonaden oder Pilze verursachten Kolpitiden von der Messung ausgeschlossen. Die zytologische Diagnostik erfolgte nach Papanicolaou. Die histologische Diagnostik, die zur weiteren Einteilung der Versuchsgruppen notwendig war, wurde an Konisationen oder Operationspräparaten durchgeführt.

Die Patientinnen, an denen diese Untersuchungen durchgeführt wurden, konnten folgenden Gruppen zugeordnet werden:

- I. Kontrolle: 10 Patientinnen mit makroskopisch und zytologisch unauffälligem Befund (Pap I und Pap II) sowie negativem Befund auf Bakterien, Trichomonaden oder Pilze dienten als Kontrolle.

II. Carcinoma in situ: 9 Patientinnen mit einem
histologisch gesicherten
(durch Aufarbeiten des
Konisationspräparates)
Carcinoma in situ.

III. Carcinom: 13 Patientinnen mit einem
histologisch (Operationsprä-
parat) nachgewiesenen inva-
siven Plattenepithelkarzinom.

b. Präparation

I. Fixation:

Alle Präparate wurden sofort nach dem Ausstreichen auf dem Objektträger einer fünfzig Minuten langen Mischfixierung unterzogen und anschließend zehn Minuten lang in destilliertem Wasser gespült. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate dann bei 4⁰C aufbewahrt.

Mischfixierung: 425 ml Methylalkohol
50 ml Formalin 10%ig
25 ml Eisessig 96%ig
(BÜHM und SPRENGER, 1968)

II. Pepsin:

Die Präparate wurden getrocknet und vier Minuten in einer Pepsinlösung bei 37⁰C inkubiert. Dadurch wurde eine Freilegung der einzelnen Zellkerne erreicht. Eine kürzere Inkubationszeit reicht nicht aus, um freigelegte Zellkerne zu erhalten. Bei einer längeren Inkubation sind dagegen die Kernmembranen zerstört und es treten Zellkernfragmente auf. HERZOG (1974) und REIFENSTUHL et al. (1971) verwenden ebenfalls die vierminütige Inkubation in einer Pepsinlösung, um eine extranukleäre Komponente der Fluoreszenz möglichst auszuschalten.

Pepsinlösung: 1g Pepsin (20 IE) auf 100 ml pH 2

Nach der Behandlung mit Pepsin wurden die Präparate gewässert, in Alkohol (absoluter Alkohol bei der Alcianblaufärbung und 70%iger Alkohol bei der Feulgenfärbung) gewaschen und anschließend der entsprechenden Färbereihe zugeführt.

IIIa. Färbereihe Alcianblau:

Abspülen in Wasser 1 Minute

Färben in Alcianblaulösung 1 Stunde

Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe

70%iger Alkohol durchziehen

96%iger Alkohol 5 Minuten

99%iger Alkohol 10 Minuten

Karbolxylol durchziehen

Xylol durchziehen

Einschließen in Eukitt (Firma O. Kindler, Freiburg)

Alcianblaulösung: 3g Alcianblau in 100 ml 2n Schwefelsäure unter Erwärmen bis 70°C mischen.

Nach dem Abkühlen filtrieren. (pH = 0,2)

IIIb. Färbereihe Acriflavin-Feulgen:

70%iger Alkohol 5 Minuten

Hydrolyse in 4n HCl bei 28°C (Wasserbad) 1 Stunde

Abspülen in Wasser

Färben im Reagenz 1 Stunde bei Zimmertemperatur

Abspülen in Wasser

Differenzieren in SO_2 -Wasser 6 mal 5 Minuten

Abspülen in Wasser

70%iger Alkohol 10 Minuten

96%iger Alkohol 10 Minuten

96%iger Alkohol 10 Minuten

Xylol 10 Minuten

Xylol 10 Minuten

Einschließen in Eukitt (Firma O. Kindler, Freiburg)

Reagenz: 0,01%ige Lösung von Acriflavin

(0,01g Acriflavin in 15 ml 1n HCl schütteln,
dazu 0,5 g Na-Pyrosulfit ($\cong$ Na-Disulfit) in
85ml Wasser)

SO_2 -Wasser: 10ml 1n HCl und 10ml einer 1%igen Lösung
von Na-Pyrosulfit und 200ml Wasser

Nach dem Einschließen in Eukitt ($n = 1,494$) sind die
Präparate für die Messung im Mikroskopcytophotometer
vorbereitet.

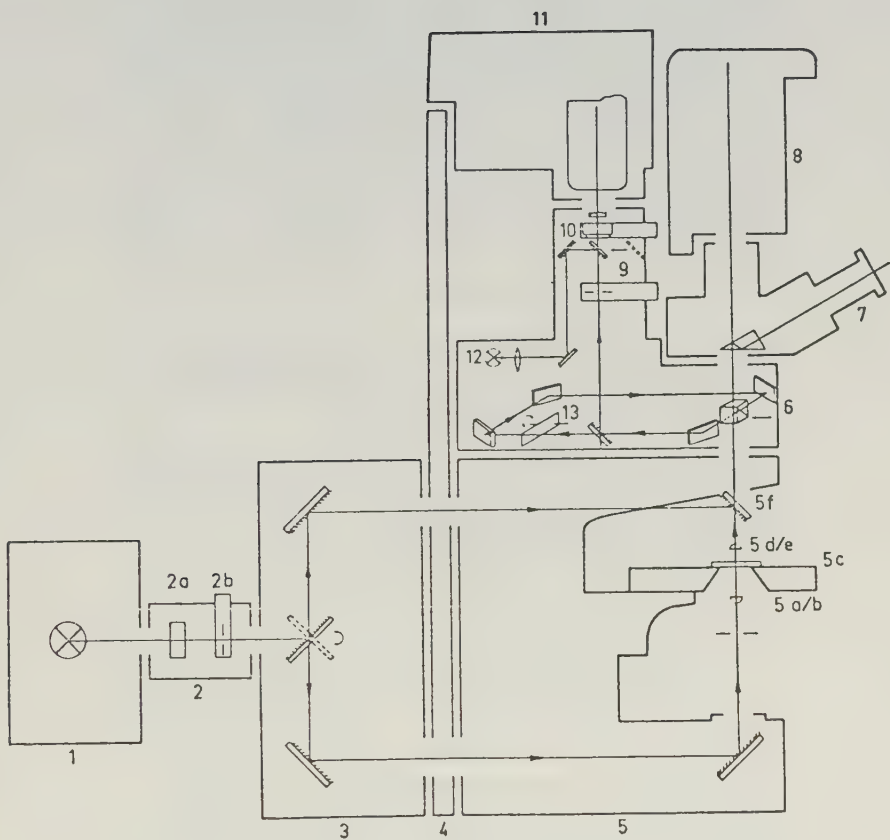
c. Meßinstrument

Der Gehalt der Zellkerne an DNA und Cystein/Cystin wurde fluoreszenz-zytophotometrisch bestimmt. Alle Messungen wurden am Mikroskopphotometer II (Leitz) durchgeführt. Die physikalischen Voraussetzungen sind sehr ausführlich von SANDRITTER (1961) dargelegt worden.

Der Strahlengang des Mikroskopphotometers II (MPV II) wird in Abbildung 6 erläutert.

Abb. 6: Schematische Darstellung des Beleutungs-
S. 21 und Photometerstrahlenganges des MPV II
(modifiziert nach Leitzangaben)

1. Lampenhaus; 2. Lampenträger; 2a. Wärmeschutzfilter und Blende; 2b. Interferenzfilter; 3. Spiegelhaus; 4. Trägerschiene;
5. Mikroskop; 5a. Kondensor; 5b. Phasenkontrastkondensor; 5c. Objekt; 5d. Objektiv;
- 5e. Phasenkontrastobjektiv; 5f. Fluoreszenzauflichtilluminator; 6. Photometrietubus;
7. Phototubus; 8. Mikroskopkamera; 9. Meßblende; 10. Interferenzfilter; 11. Photovervielfacher; 12. Pilotlampe; 13. Dunkelklappe



Die Fluoreszenz der zytophotometrischen Messungen wurde im Auflicht angeregt und über einen Kantenfilter, der wie alle Filter von der Firma Schott in Mainz hergestellt wurde, photometrisch bestimmt. Bei der DNA-Feulgen-Acriflavin-Messung wurde die rotgelbe Eigenfluoreszenz durch Blaulicht (Filter KP 390) angeregt und über einem Kantenfilter (K 580) gemessen. Bei der Cystin-Alcianblau-Messung wurde durch Blaulicht (Filter KP 390) angeregt und die blaue Eigenfluoreszenz über einem Kantenfilter (K 480) gemessen. Der Strahlengang verläuft gemäß der Abbildung 6 in folgender Weise:

1 - 2a - 3 - 5f - 5e - 5c - 5e - 6 - 9 - 10 - 11.

Dem MPV II war ein Elektronikschrank mit Versorgungseinheiten für Lichtquellen, Photovervielfacher, Meßablaufsteuerung und Anzeigensystem angeschlossen.

Die jeweils 100 Einzelmessungen pro Präparat wurden digital angegeben und durch einen angeschlossenen Ein-Kanal-Schreiber aufgezeichnet. Vor jeder Messung wurde das Gerät geeicht ("Nine-Position-Test" BÖHM und SPRENGER, 1970).

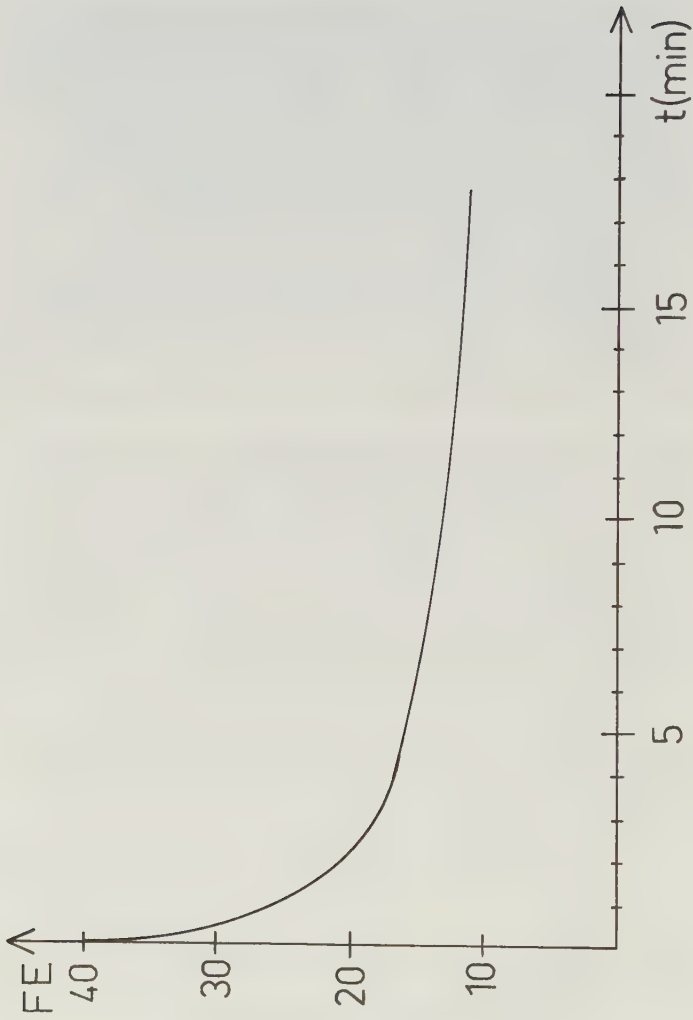
d. Messung am Cytophotometer

Alle Präparate wurden im Leitz MPV II gemessen. Um das Ausbleichen der Zellkerne während des Meßvorganges (Ausbleichkurve, Abb. 7 bei Fluoreszenzanregung im Blaulicht) möglichst gering zu halten, wurden die Zellen im Phasenkontrastbild aufgesucht und dann erst durch Auflicht zur Fluoreszenz angeregt. Bei dem Aufsuchen der Zellen im Phasenkontrastbild wurden diese auch auf ihre Integri-

tät überprüft. Auf diese Weise wurden defekte Zellkerne von der Messung ausgeschlossen. Um individuelle Schwankungen in den Messungen zu umgehen, wurden jeweils 100 Einzelmessungen pro Präparat abgegriffen und auf einem 1-Kanal-Schreiber (Servogor) zur Dokumentation erfaßt. Die Leitzahl des Präparates ergab sich aus dem arithmetischen Mittel dieser 100 Einzelmessungen. Die auf die Präparate aufgebrachten menschlichen Spermien dienten als Eichzacke. Durch Änderung der Spannung am Photomultiplier wurden die "Spermien-Werte" aneinander angeglichen. Erst dann erfolgte die Messung. Die Präparate wurden durch dieses Vorgehen untereinander vergleichbar.

Fehler, die durch eine sehr geringfügige Eigenfluoreszenz der Farblösung und durch kleine, nicht durch die Pepsininkubation zu entfernende Eiweißpartikel (meist Reste der Zellmembran und des Zytoplasmas) auftraten, konnten durch Berücksichtigung des Leerwertes direkt neben dem gemessenen Zellkern stark verringert werden. Unter Berücksichtigung des Eichwertes wurden alle 100 Einzelwerte eines Präparates in Histogrammen aufgetragen. Aus den jeweils 100 Einzelwerten pro Präparat wurden Mittelwert und Standardabweichung errechnet. Die Streuung der einzelnen Präparate bzw. Versuchsgruppen wurde durch die Ermittlung der Standardabweichung bestimmt.

Abb. 7: Ausbleichkurve eines mit Alcianblau angefärbten
S. 24 Zellkernes
(FE: Fluoreszenzeinheiten; t: Zeit)



ERGEBNISSE

a. Nachweis der semiquantitativen Vergleichbarkeit der Färbemethoden

DNA:

Die Spermien (Sp), die einen haploiden Chromosomensatz aufweisen, zeigen übereinstimmend einen Gipfel im haploiden Bereich der einzelnen Histogramme, wobei die mittlere Leitzahl 9,6 beträgt. Die Thymuslymphocyten (Th) haben ihren Gipfel im diploiden Bereich (mittlere Leitzahl: $\bar{X} = 15,7$). Der Quotient der Mittelwerte (der mittleren Leitzahlen) von Spermien und Thymuslymphocyten, die alle nach der Feulgen-Acriflavin-Methode gefärbt wurden, hat einen Betrag von 0,61.

Cystein/Cystin:

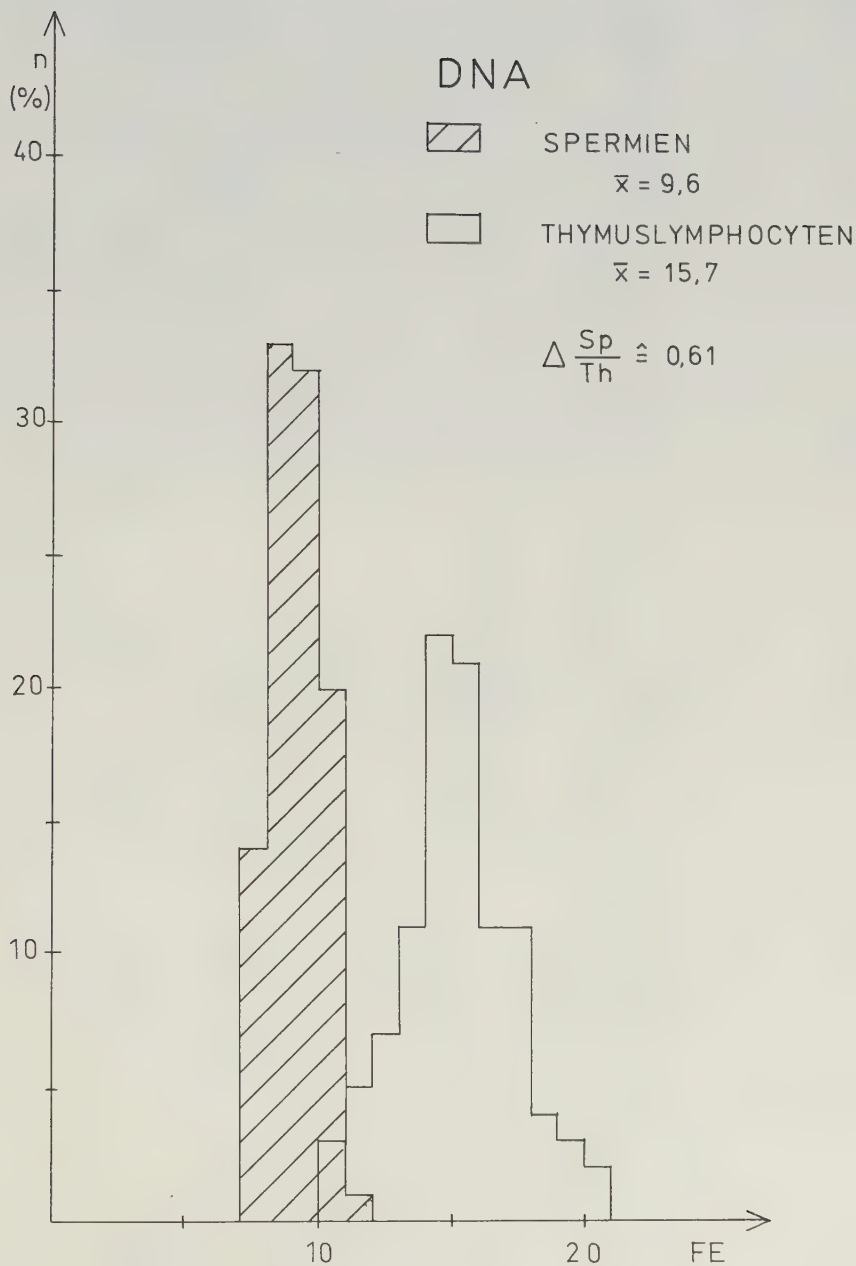
Ähnlich wie bei der Feulgen-Acriflavin-Färbung zur Darstellung der DNA zeigen die zur Messung des Cystein-/Cystin-Gehaltes alcianblau gefärbten Spermien einen haploiden Gipfel ($\bar{X} = 8,4$) und die in gleicher Weise gefärbten Thymuslymphocyten ein Maximum im diploiden Teil der Histogramme ($\bar{X} = 13,6$). Der Quotient aus den mittleren Spermienleitzahlen und den mittleren Thymuslymphocytenleitzahlen beträgt 0,62.

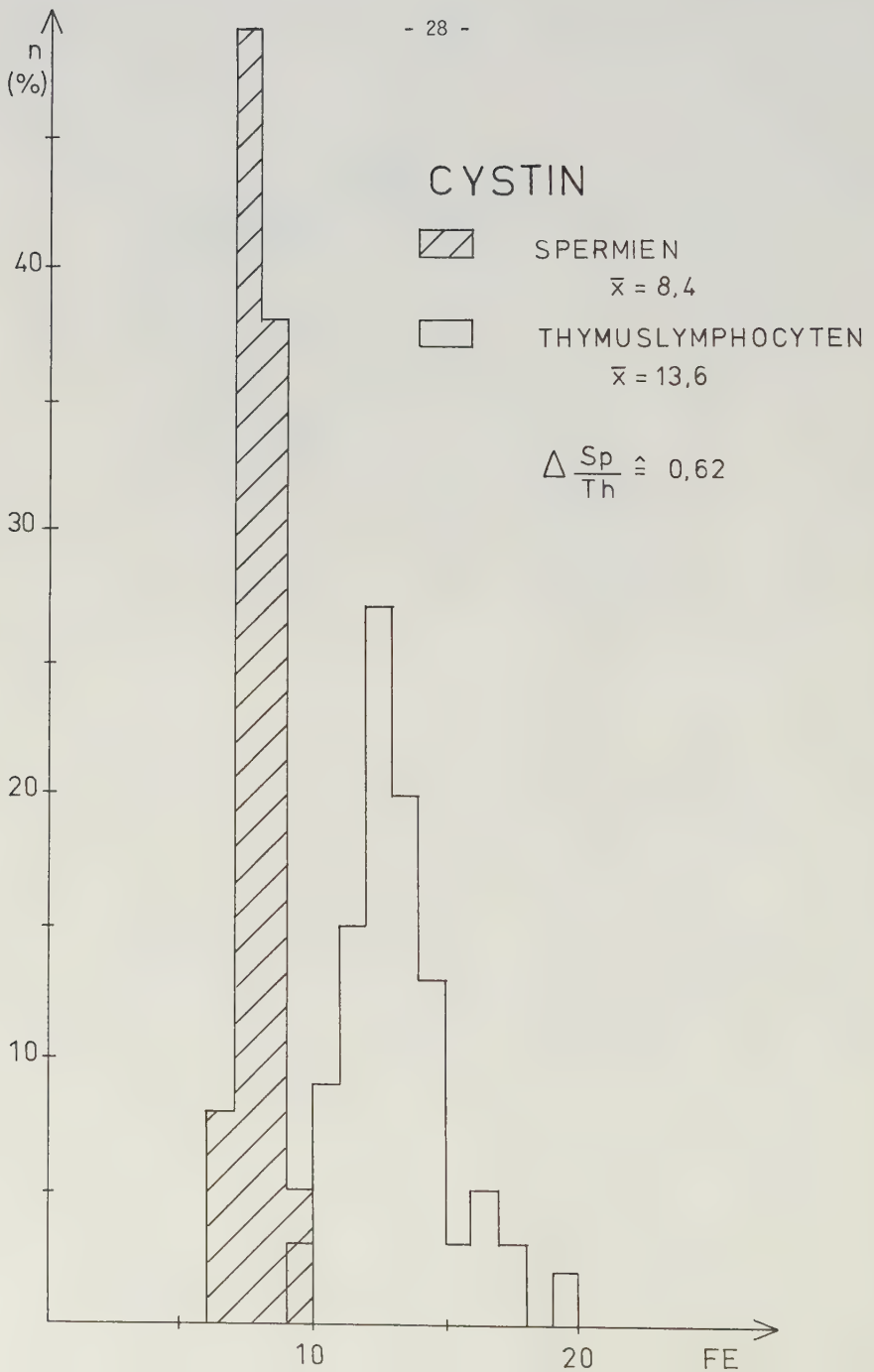
Auswertung:

Beim Vergleich des Quotienten ($\Delta \frac{Sp}{Th}$) der DNA-Meßreihe mit dem entsprechenden Quotienten der Cystein-/Cystin-Meßreihe läßt sich keine signifikante Abweichung der Ergebnisse untereinander feststellen. Der geringere Betrag der absoluten Werte bei Cystein/Cystin im Gegensatz zu denen bei DNA-Präparaten liegt in der Methode selbst begründet. Da aber der Quotient beider Meßreihen eine markante Übereinstimmung in den Ergebnissen aufweist, wird die Anwendbarkeit der Methodik empirisch bestätigt. Die Vergleichbarkeit von feulgengefärbten Präparaten mit alcianblau gefärbten Präparaten wird mit dieser Meßreihe nachgewiesen. Damit ist die Basis für den semiquantitativen Vergleich des DNA-Gehaltes mit dem Cystein-/Cystin-Gehalt semimaligner bzw. maligner Zellkerne des Plattenepithels der menschlichen Portio gelegt.

Abb. 8: Histogrammische Verteilung der DNA-Werte anhand S. 27 eines Beispieles (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: mittlere Leitzahl (Mittelwert des Histogramms); $\Delta \frac{Sp}{Th}$: Quotient aus den mittleren Leitzahlen der Spermien und der Thymuslymphocyten)

Abb. 9: Histogrammische Verteilung der Cystein-/Cystin-Werte S. 28 anhand eines Beispiels (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: mittlere Leitzahl; $\Delta \frac{Sp}{Th}$: Quotient aus den mittleren Leitzahlen der Spermien und der Thymuslymphocyten)





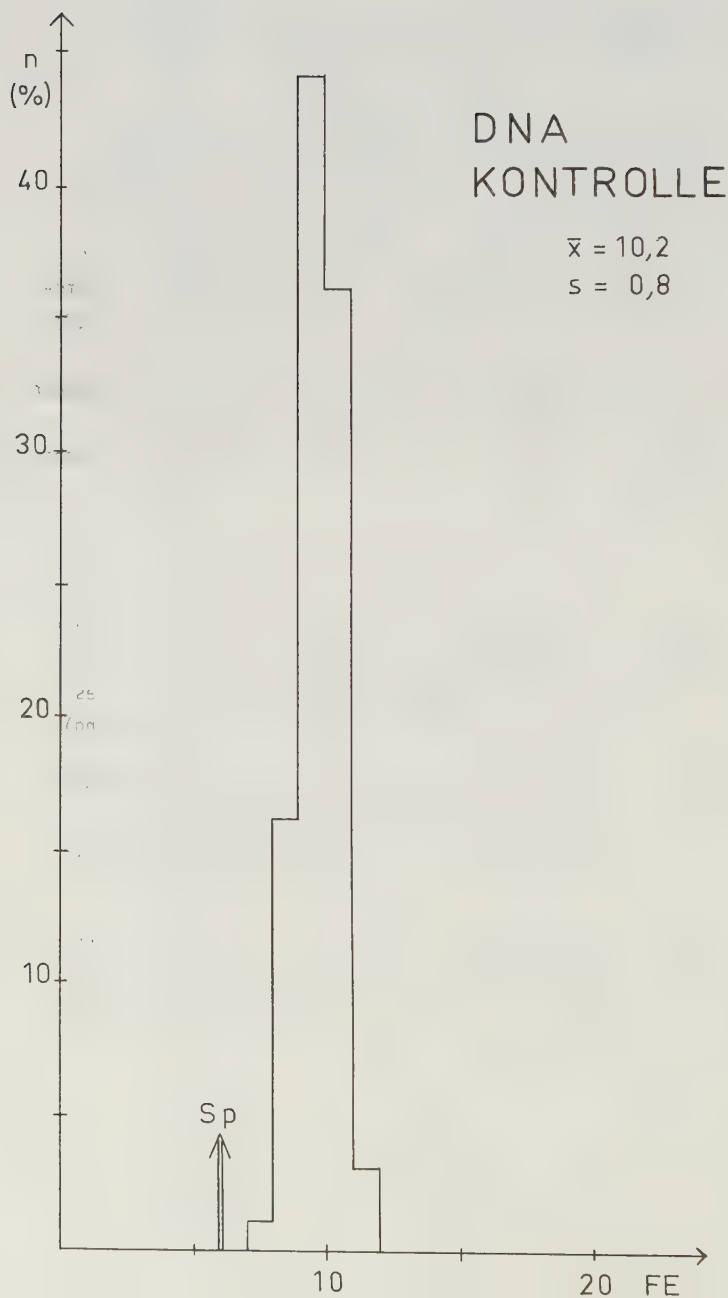
b. Feulgen-Acriflavin-Färbung zum Nachweis der DNA im Zellkern

Während die pathologisch unauffälligen Präparate ihren DNA-Gipfel deutlich im diploiden Bereich ($\bar{X} = 10,3$) besitzen, zeichnen sich die Präparate, die ein histologisch nachgewiesenes Carcinoma in situ aufweisen, durch einen dominierenden diploiden Gipfel sowie vermehrt auftretende DNA-Werte im interdiploiden, tetraploiden Bereich der Histogramme aus ($\bar{X} = 11,5$). Bei den Karzinompatienten ($\bar{X} = 13,6$) kann man eine weiter zunehmende Rechtsverschiebung in den hypertetraploiden Sektor beobachten. Zusätzlich zum diploiden Hauptgipfel werden bei diesen Präparaten noch relative Maxima im hyperdiploiden Teil der Histogramme deutlich sichtbar.

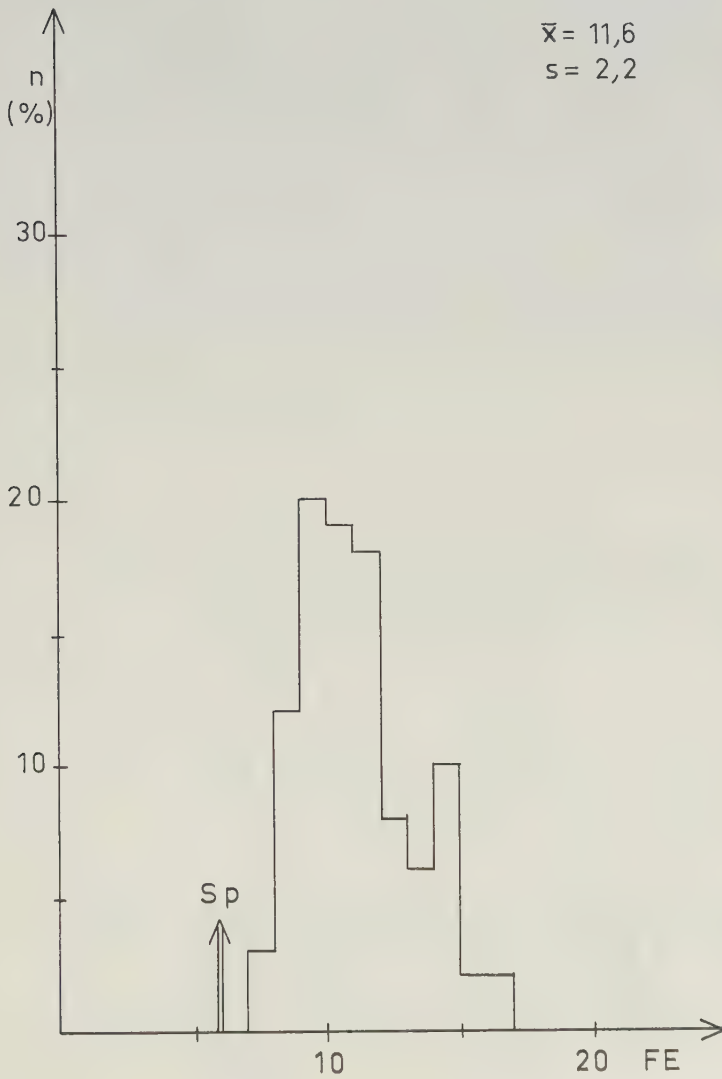
Abb. 10: Histographische Verteilung der DNA-Werte anhand
S. 30 eines Beispiels der Gruppe "Kontrolle" (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms (Mittelwert); s: Standardabweichung)

Abb. 11: Histographische Verteilung der DNA-Werte anhand
S. 31 eines Beispiels der Gruppe "Carcinoma in situ" (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms; s: Standardabweichung)

Abb. 12: Histographische Verteilung der DNA-Werte anhand
S. 32 eines Beispiels der Gruppe "Carcinom" (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms; s: Standardabweichung)



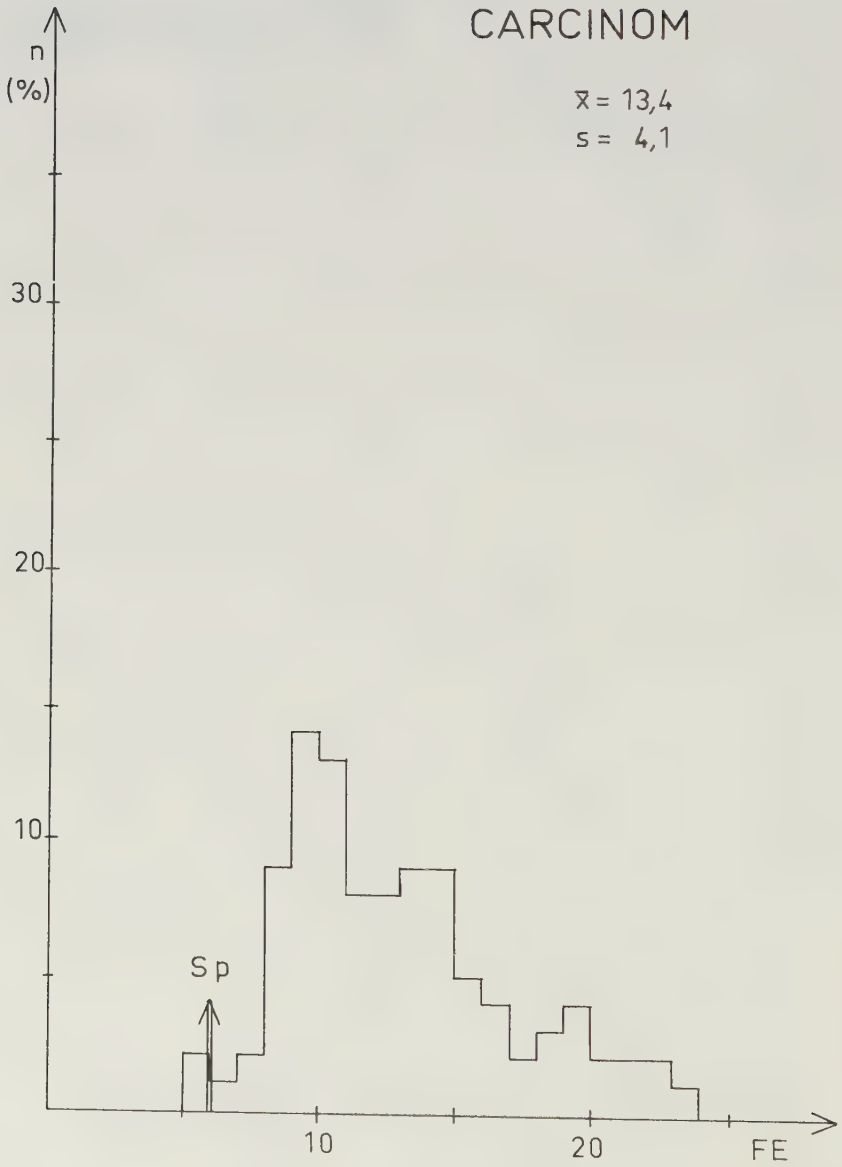
DNA CARCINOMA IN SITU



DNA CARCINOM

$$\bar{x} = 13,4$$

$$s = 4,1$$



c. Alcianblau-Färbung zum Nachweis des Cysteins/Cystins
im Zellkern

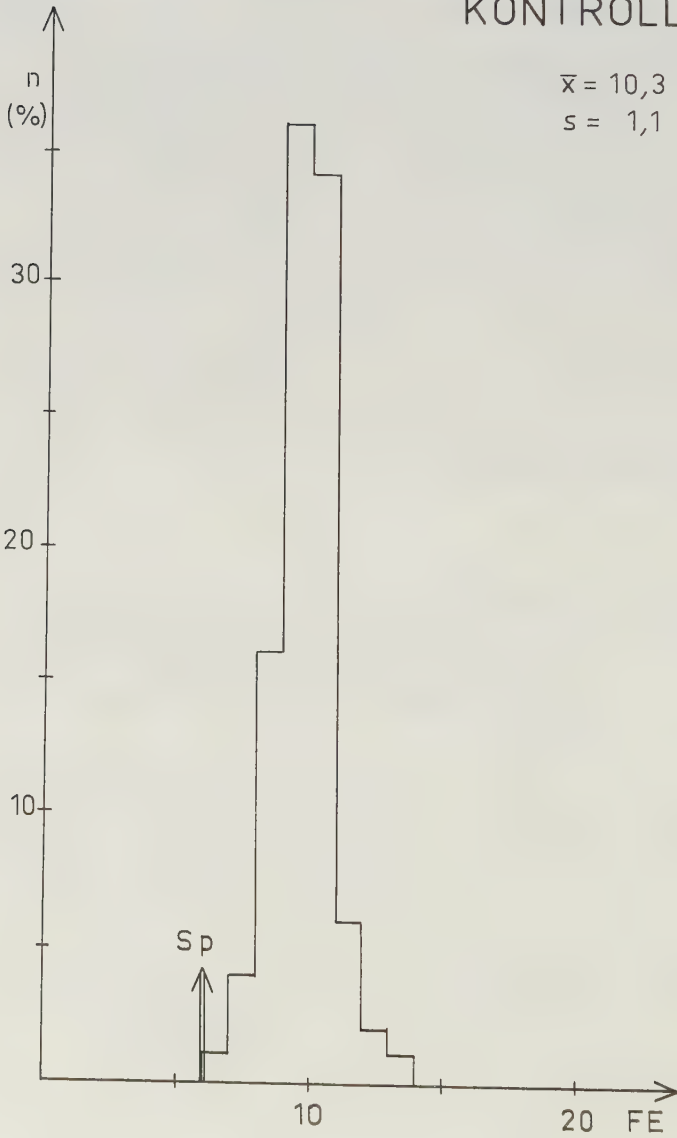
Die Verteilung der Cystein-/Cystin-Werte entspricht nahezu der Anordnung der DNA-Werte. Die Kontrollen weisen einen ausgeprägten diploiden Gipfel auf ($\bar{X} = 10,5$). Im weiteren Verlauf der Karzinomentstehung bleibt dieser Hauptgipfel im diploiden Bereich zwar bestehen, aber es tritt eine zunehmende Rechtsverschiebung in den Histogrammen auf. Die mittlere Leitzahl erhöht sich in diesem Zusammenhang bei den Carcinomata in situ - Präparaten auf $\bar{X} = 11,5$ und bei den Präparaten der invasiven Karzinome auf $\bar{X} = 14,0$. Bei den Karzinomen findet man neben der erwähnten Rechtsverschiebung auch breitere Streuungen in den Histogrammen. Es lassen sich weitere relative Maxima im hyperdiploiden Bereich der Histogramme beobachten.

Abb. 13: Histogrammische Verteilung der Cystein-/Cystin-
S. 34 Werte anhand eines Beispiels der Gruppe "Kontrolle".
(n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms (Mittelwert); s: Standardabweichung)

Abb. 14: Histogrammische Verteilung der Cystein-/Cystin-
S. 35 Werte anhand eines Beispiels der Gruppe "Carcinoma in situ". (n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms; s: Standardabweichung)

Abb. 15: Histogrammische Verteilung der Cystein-/Cystin-
S. 36 Werte anhand eines Beispiels der Gruppe "Carcinom".
(n: Zellzahl; FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Leitzahl des Histogramms; s: Standardabweichung)

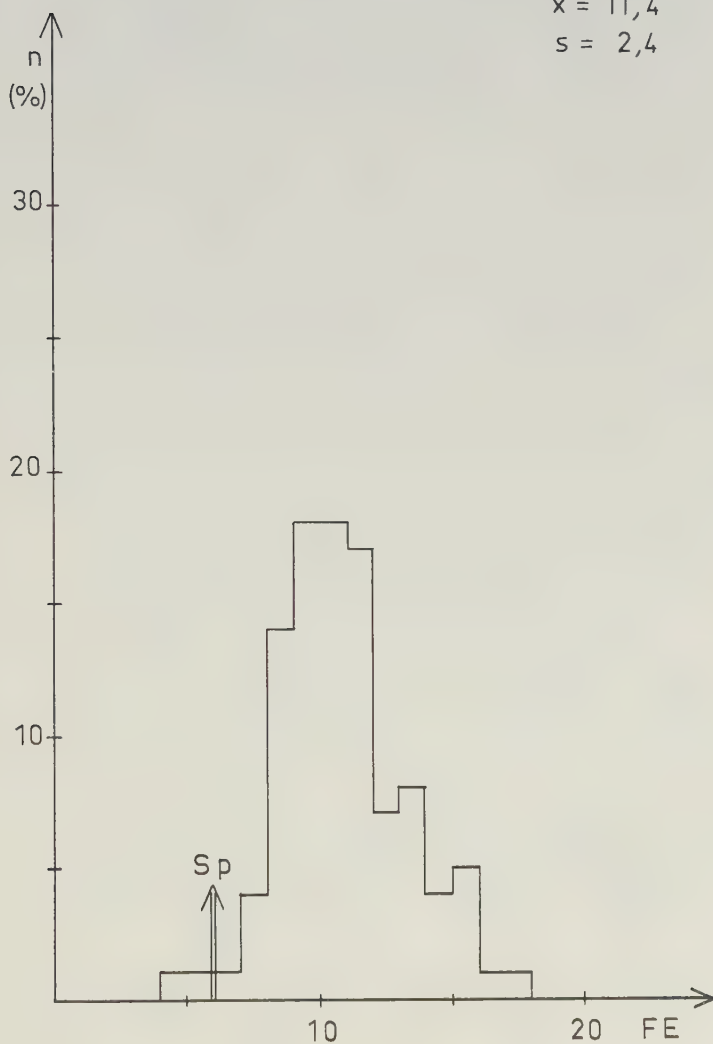
CYSTIN KONTROLLE



CYSTIN CARCINOMA IN SITU

$$\bar{x} = 11,4$$

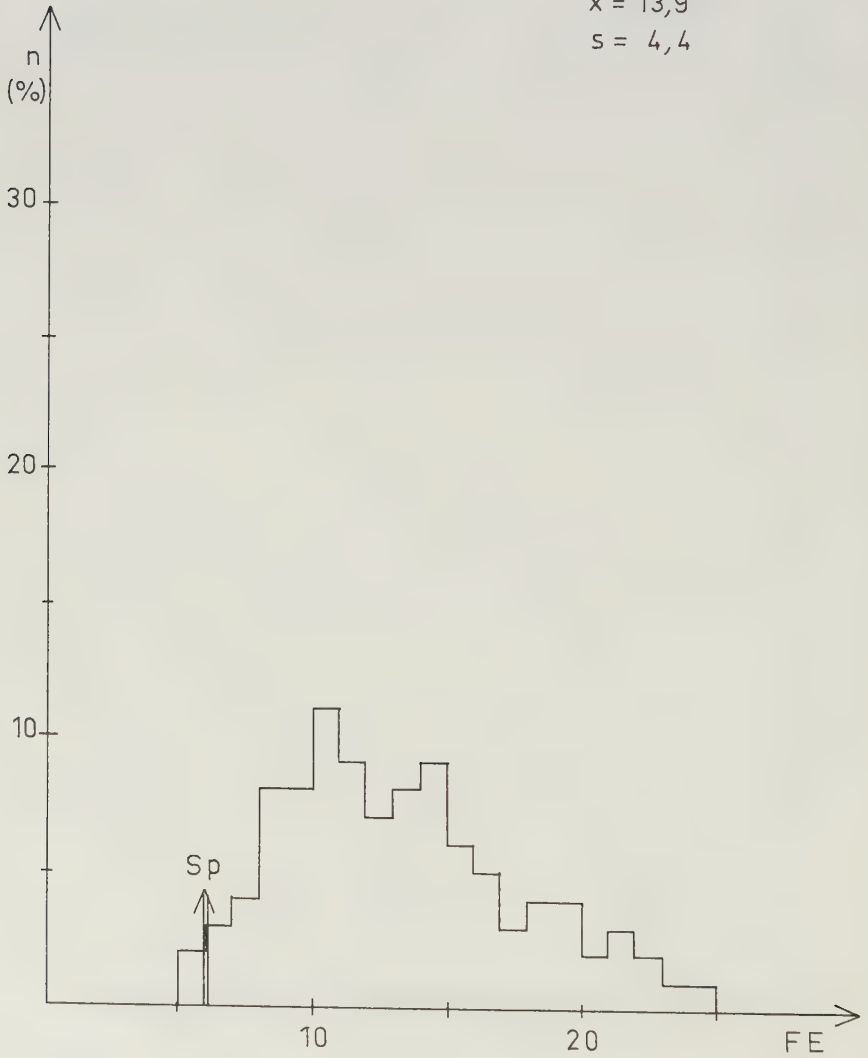
$$s = 2,4$$



CYSTIN CARCINOM

$$\bar{x} = 13,9$$

$$s = 4,4$$



d. Statistische Analyse

Generell läßt sich, bei einer vergleichenden Betrachtung der einzelnen Histogramme, ein kontinuierlicher Anstieg der mittleren Leitzahlen von den Kontrollen über die Carcinomata in situ bis zu den invasiven Karzinomen - sowohl bei den DNA-gefärbten Präparaten als auch bei der Cystein-/Cystin-Meßreihe - feststellen. Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen sind die Abweichungen der "Einzelhistogramme" von den statistisch ermittelten Werten minimal. Bei den Kontrollfällen schwanken die mittleren Leitzahlen im Mittel zwischen 9,2 und 11,4 für DNA und zwischen 9,7 und 11,3 für Cystein/Cystin. Diese Mittelwerte liegen für die Carcinomata in situ zwischen 10,5 und 12,5 für DNA bzw. 10,2 und 12,8 für Cystein/Cystin. Aus den cytophotometrisch gemessenen Präparaten der Gruppe invasives Karzinom wurden folgende Bereiche statistisch ermittelt: DNA 12,0 bis 15,2 und Cystein/Cystin 11,9 bis 16,1.

Der Übergang von den Kontrollen zu den Carcinomata in situ ist bei allen Präparaten deutlich ausgeprägt. Die Stufe von Carcinom in situ zum invasiven Karzinom, die in allen Präparaten bzw. Meßreihen in gleicher Weise auftritt, zeigt sich noch prägnanter. Die kontinuierliche Stufung, wie sie im Zusammenhang mit der Karzinogenese der menschlichen Protio zu beobachten ist, geht bei DNA- und Cystein/Cystin-Präparaten parallel.

Alle gemessenen Kontrollfälle zeigen eine Verteilung, die nur einen Gipfel im diploiden Bereich der Histogramme aufweist. Im Gegensatz hierzu ist beim Carcinoma in situ

eine deutliche Verschiebung in den hypertetraploiden Bereich festzustellen. Betrachtet man die Mittelwerte der Leitzahlen von den drei Patientengruppen (Kontrolle, Carcinoma in situ, Carcinom), so tritt diese Tendenz der Rechtsverschiebung im Rahmen der Karzinomentstehung noch sehr viel deutlicher zutage als bei den einzelnen Präparaten. Dieses Verhalten wird durch die Abbildungen 16 und 17 verdeutlicht.

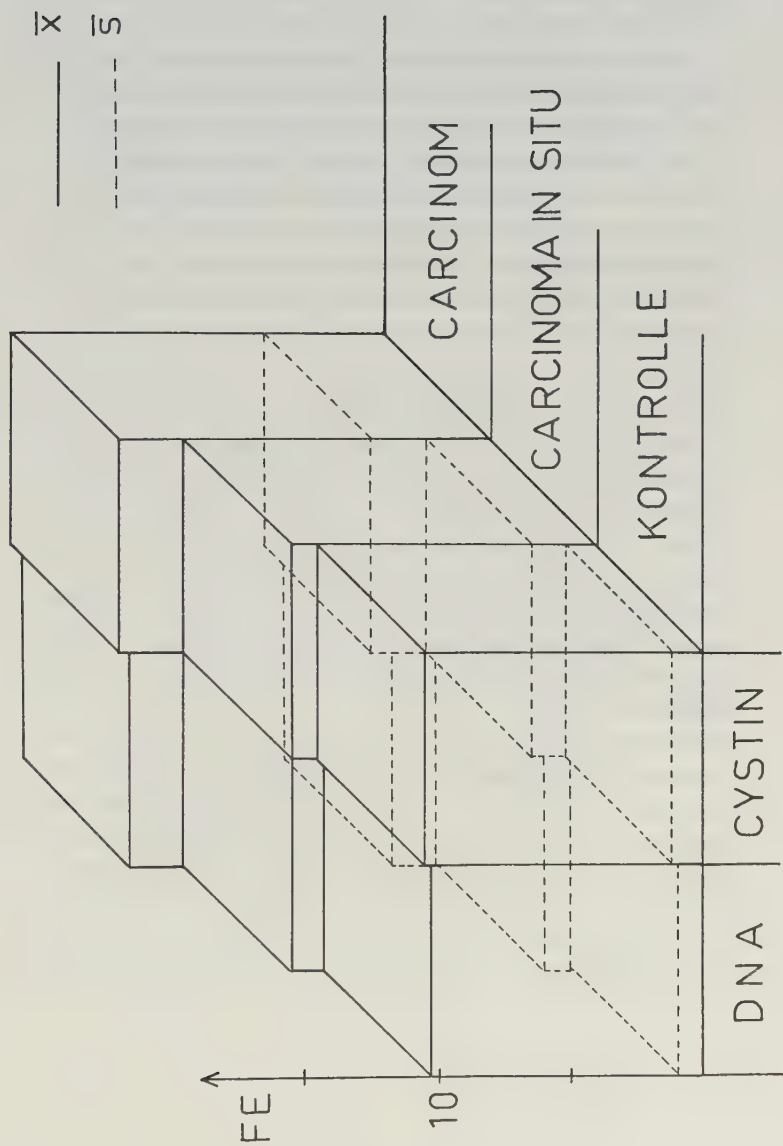
Die Analyse der Standardabweichungen, die das Maß der Streuung veranschaulichen, zeigt adäquate Verhaltensweisen. Die erhöhte Anzahl atypischer DNA-Werte im Zellkern, wie sie im Zusammenhang mit der Kanzerisierung auftreten, findet ebenfalls einen Niederschlag in den Standardabweichungen. Die mittlere Standardabweichung zeigt eine kontinuierliche Zunahme der Streuung von den Kontrollen über die Carcinomata in situ bis zu den invasiven Karzinomen. Die Mittelwerte der Streuung sind beim Übergang von der Kontrolle zum Carcinoma in situ um 1,1 für DNA und 1,3 für Cystein/Cystin deutlich erhöht. Die Stufe zwischen Carcinoma in situ und invasivem Karzinom erscheint viel ausgeprägter; der Wert lautet für DNA 1,7 und für Cystein/Cystin 2,1. Dieses den Mittelwerten analoge Verhalten der statistisch ermittelten Streuungen unterstreicht noch einmal den Übergang von dem Gipfel im diploiden Bereich zu mehreren Gipfeln, wie sie bei der Karzinogenese zu beobachten sind, und die damit verbundene, zunehmende Rechtsverschiebung der mittleren Leitzahlen in den Histogrammen.

Die Abbildungen 16 und 17 verdeutlichen dies tabellarisch und graphisch.

Abb. 16: Mittlere Leitzahlen und mittlere Standard-
S. 40 abweichungen aller Histogramme.
($\bar{X}$: Mittelwerte der Leitzahlen, in Klammern:
Streuung der Leitzahlen; $\bar{S}$: Mittelwerte der
Standardabweichungen, in Klammern: Streuung
der Standardabweichungen)

Abb. 17: Graphische Darstellung der mittleren Leitzahlen
S. 41 und mittlere Standardabweichungen aller Histogramme. (FE: Fluoreszenzeinheiten; $\bar{X}$: Mittelwerte der Leitzahlen; $\bar{S}$: Mittelwerte der Standardabweichungen)

		DNA	CYSTIN
KONTROLLE	$\bar{x}$	10,3 ($\pm 1,1$)	10,5 ($\pm 0,8$)
	$\bar{s}$	1,0 ($\pm 0,3$)	1,2 ($\pm 0,5$)
CARCINOMA IN SITU	$\bar{x}$	11,5 ($\pm 1,0$)	11,5 ($\pm 1,3$)
	$\bar{s}$	2,1 ($\pm 0,7$)	2,5 ($\pm 1,1$)
CARCINOM	$\bar{x}$	13,6 ($\pm 1,6$)	14,0 ($\pm 2,1$)
	$\bar{s}$	3,8 ($\pm 1,1$)	4,6 ($\pm 1,7$)



DISKUSSION

Bei vergleichender Betrachtung aller Histogramme der in Toto gemessenen Zellkerne, läßt sich neben kontinuierlichen Übergängen von den Kontrollen über die Carcinomata in situ bis zu den Karzinomen, generell ein langsamer aber deutlicher Anstieg der DNA-Werte feststellen. Ein ähnliches Verhalten kann man auch bei den gemessenen Cystein-/Cystin-Werten registrieren. Der Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigt keine deutlichen Differenzen.

Im Zusammenhang mit der Karzinogenese werden in den Histogrammen eine erhöhte Streuung und Rechtsverschiebung erkennbar, die sowohl die DNA als auch die Histone betreffen (SANDRITTER und FISCHER, 1962; HERZOG, 1974 und 1977); das heißt, es treten mehr Zellen mit einem aneuploiden DNA-Gehalt auf, dem dann wiederum der Histongehalt entspricht. Zusätzlich zeigen die maligne veränderten Zellen einen erhöhten Heterochromationanteil (SANDRITTER, 1970; BÖHM und SANDRITTER, 1976).

Da die Histone die Grundstruktur der Chromationfibrille darstellen und als Stützstrukturen der DNA-Doppelhelix fungieren, fügen sich die erhaltenen Ergebnisse widerspruchsfrei in den erwarteten Zusammenhang ein und bestätigen die gängige Auffassung (ZUBAY und DOTY, 1959).

Einzelne Histonfraktionen sind für die extreme Verdichtung (Aufschraubung) der DNA in heterochromatischen Regionen verantwortlich (NELSON UND YUNIS, 1969). Das Anwachsen des Verhältnisses DNA : Histon ist gleichverlaufend mit einem Wechsel im physikalischen Zustand des Chromatins (ALLFREY, 1971). Das Genom wird durch Interaktionen der DNA mit den Histonen und durch spezifische Wechselbeziehungen der Histone untereinander gebildet. Die Histonfraktionen H2a, H2b, H3 und H4 bilden Heteropolymere, die das zentrale Strukturelement der eukaryoten Chromosomen darstellen (FRANKLIN, 1977; BAFUS et al., 1978). Ein Modell der Chromatinstruktur besteht aus sich wiederholenden Einheiten (Nukleosome), die jeweils aus 8 Histonmolekülen - umgeben von 200 Basenpaaren - aufgebaut sind (KORNBERG, 1974; NOLL et al., 1975). Das Histonpaar H3 und H4 ist nach BOSELEY et al. (1976) für die Bildung einer regulären höheren Ordnungsstruktur im Chromatin verantwortlich. Die DNA muß sich in den Nukleosomen auf den dritten Teil ihrer ursprünglichen Länge verkürzen, woraus sich dieser aufspiralisierte Komplex ergibt (GERMOND et al., 1975). FINCH et al. (1977) untersuchen ebenfalls die Zusammensetzung von Histonen und DNA im Nukleosom. Sie stellen fest, daß sich das Chromatin aus Nukleosomen zusammensetzt, die eine genaue definierte Länge an DNA enthalten, wobei die DNA wiederum mit einem Oktamer-Aggregat von Histonen verbunden ist. Dieses Histon-Aggregat setzt sich jeweils aus einem Paar der vier Haupttypen der einzelnen Histonfraktionen (H2a, H2b, H3, H4) zusammen.

Die DNA kann - ohne Interaktionen der Histonfraktionen H2a und H2b - allein durch die argininreichen Histonanteile H3 und H4 gefaltet werden; und H3 ist nach FAMBROUGH und BONNER (1968) die einzige Histonfraktion, die die Aminosäure Cystein/cystin enthält. Das H3-H4-Tetramer bildet die Basis des Nucleosoms und dient zur Steuerung der Supercoiling der DNA; die lysinreichen Histonfraktionen H2a und H2b vervollständigen lediglich die Struktur des Nukleosoms (FINCH et al., 1977).

Die Bindung von den Histonen zur DNA im Chromatin beinhaltet eine begrenzte Zahl an spezifischen und sehr genau definierten Kontakten zwischen Protein und Nukleinsäure und wird durch die strukturellen Eigenschaften der Histone bestimmt (AXEL et al., 1974). Die enge Verbindung zwischen DNA und Histon, bzw. die Basisfunktion der Histone beim Aufbau der Chromatinstruktur, erklärt den erhöhten DNA- und Cystein-/Cystin-Gehalt, wie er bei der Kanzerisierung der menschlichen Portio zu verzeichnen ist. Das Verhältnis DNA : Histon im Chromatin ändert sich, wie es die vorliegenden Ergebnisse zeigen, im Zusammenhang mit der Karzinogenese und der damit verbundenen Heterochromatisierung nicht. Im Euchromatin wie auch im Heterochromatin läßt sich der gleiche Betrag jeder Histonfraktion aus der Chromatinfibrille extrahieren (PALLOTTA et al., 1970). Euchromatin und Heterochromatin zeigen beide keine wesentlichen Unterschiede in der Basenzusammensetzung der DNA und enthalten ungefähr die gleiche Menge an Histonen. Diese Fakten deuten darauf hin, daß die DNA-Fibrille im aktiven Chromatin weniger fest durch seine Histone zusammenge-

faßt ist, als es die DNA des inaktiven Chromatins ist (FRENSTER, 1965).

Bevor eine genauere Deutung und Einordnung der experimentell erhaltenen Ergebnisse erfolgt, soll der Einfluß möglicher Fehlerquellen auf die Messungen diskutiert werden.

Eine der möglichen Fehlerquellen bei den fluoreszenzcytophotometrischen Untersuchungen des DNA- und Cystein-/Cystin-Gehaltes ist -wie oben bereits erwähnt- der Schwund, der durch Ausbleichen entsteht. Durch das Aufsuchen der zu messenden Zellkerne im Phasenkontrastbild, durch kurz gehaltene Meßzeiten und durch mäanderförmiges Abfahren des Präparates (häufiger Wechsel der Meßorte) konnte dieser Fehler gering gehalten werden. Es muß aber festgestellt werden, daß ein geringer Teil der Streuungen, in den erhaltenen Histogrammen, eine Folge des Ausbleichens ist, wodurch sich für die Mittelwerte aller Histogramme niedrigere Werte ergeben. Obwohl durch schonende Proteolyse der Präparate mit Pepsin eine extranukleäre Komponente der Fluoreszenz weitgehend ausgeschaltet wurde, kann davon ausgegangen werden, daß dies nicht vollständig gelungen ist. Im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit können diese methodischen Fehler jedoch vernachlässigt werden, da bei allen durchgeführten Messungen die Meßbedingungen die gleichen waren und alle Präparate der schonenden Proteolyse mit Pepsin unterzogen wurden. Es werden bei der Auswertung auch nicht die absoluten Einzelwerte miteinander verglichen, sondern es werden stets die Mittelwerte aus 100 Einzelmessungen

pro Präparat zum Vergleich herangezogen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in der Arbeitshypothese, daß man durch die Bestimmung der SH- und SS-Gruppen (Cystein/Cystin) im Zellkern eine Aussage über die ganze cystein- bzw. cystin-reiche Histonfraktion treffen kann. Die Aminosäure Cystein/Cystin befindet sich nicht nur in der Histonfraktion H3, sondern auch in Residualproteinen und sauren Kernproteinen (MARQUARDT nach ALTMANN, 1971). DEAKIN et al. (1963) haben gefunden, daß 76-69% des Thiolgehaltes (SH-Gehaltes) im Zellkern mit den argininreichen Histonfraktionen assoziiert sind. Ein ähnliches Ergebnis geben auch MARCH et al. (1964) und WILHELM et al. (1971) an, so daß die Residualproteine im Rahmen dieser semiquantitativen Messungen vernachlässigt werden können. Es soll in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen werden, daß in dieser Arbeit nur semiquantitative Aussagen getroffen werden.

Methionin, ebenfalls eine schwefelhaltige Aminosäure, kann schon allein durch die Spezifität der Färbung von der Messung ausgeschlossen werden (ADAMS und SLOPER, 1956).

Der Schwefel des Zellkerns ist größtenteils in der Form von Proteinbrücken (SS-Brücken) vorhanden und ungefähr 70% der gesamten Thiolgruppen sind mit der Histonfraktion F3 assoziiert (ORD und STOCKEN, 1968; HNILICA, 1972). Das Vorhandensein von reaktiven SH-Gruppen bedeutet die Anwesenheit von Cystein, wobei die Histonfraktion F3 die einzige der fünf Fraktionen (H1, H2a, H2b, H3 und H4 oder F1, F2a1, F2a2, F2b, F3) ist, die diese Aminosäure ent-

hält (FAMBROUGH und BONNER, 1968). Da bekannt ist, daß die Aminosäure Cystein nur in F3 vorkommt, kann die Bildung von Disulfidbrücken auch nur diese eine Histonfraktion betreffen (BLASZEK und BUKARESTI, 1964; ALLFREY, 1971). Der gesamte Betrag an Cystein stimmt mit dem Thiolgehalt überein; speziell in den Proteinen zählt diese Aminosäure für alle Thiolgruppen und damit für die gesamte Cysteinsäure (HESS und SULLIVAN, 1943; PHILLIPS, 1965). Das Verhältnis der Thiole (reduzierte, aktive Form) zu dem Disulfidgehalt (oxydierte Form) verändert sich während der Perioden der Strukturveränderungen im Kern, wobei sich in metabolisch inaktivem Chromatin ein höherer Disulfidanteil befindet (ORD und STOCKEN, 1969; ALLFREY, 1971). Aufgrund des Cysteingehaltes formt F3, durch sich gegenseitig beeinflussende Schwefelbrücken, polymer zusammengesetzte Moleküle. F3 selbst ist aus einer Mischung von Mono- und Dimeren zusammengesetzt. Die Anordnung der Disulfidbrücken zwischen den einzelnen F3 Molekülen ergibt sich daraus, daß diese Histone eine elektrophoretische Heterogenität aufweisen. Der Übergang von der reduzierten (SH) zur oxydierten (SS) Form von F3 steht mit der Kondensation des Chromatins in Verbindung. Die reversible Anordnung der Disulfidbrücken zwischen den SH-Gruppen von F3 und einigen Nicht-Histon-Proteinen kann zu einer Kondensation des Chromatins während der Chromosomenbildung führen (PANYIM et al., 1971; HNİLICA, 1972).

Als Schlußfolgerung aus diesen semiquantitativen Messungen kann festgestellt werden, daß sich die Cystein-/Cystin-Werte in einer ähnlichen Art und Weise verhalten wie die gemessenen DNA-Werte und mit den bekannten Ergebnissen Lysin, Arginin und Gesamthiston korrelieren (HERZOG, 1977). Die Veränderungen in den absoluten DNA-Cystein-/Cystin-Werten lassen sich durch Zunahme des Heterochromatins während der Karzinogenese erklären, wobei aber die DNA-Histon-Relation und damit auch das Verhältnis DNA : Cystein/Cystin erhalten bleibt. In allen Versuchsgruppen (Kontrolle, Carcinoma in situ, invasives Karzinom) liegt die gleiche Grundstruktur des Chromatins vor, und die ansteigenden Werte sind lediglich als Folge der überschießenden DNA-Synthese anzusehen. Somit erscheint evident, daß sich die DNA-Cystein-/Cystin-Relation im Rahmen der Karzinogenese der menschlichen Portio uteri nicht verändert.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden semiquantitative Untersuchungen über den DNA-Gehalt und den Cystein-/Cystin-Gehalt in Zellkernen der maligne veränderten Portio uteri durchgeführt.

Maligne Tumoren und auch ihre Vorstufen zeichnen sich durch abnorme Erhöhungen des DNA-Gehaltes, bzw. durch atypische Chromosomensätze, aus. Die im Zellkern enthaltenen sauren und basischen Kernproteine verhalten sich weitgehend analog. Die Histone (basische Proteine) bilden mit der DNA-Doppelhelix eine strukturelle Einheit und sind für die Aufschraubung der Chromatinfibrille verantwortlich. Eine wesentliche Rolle beim Aufbau der Chromatinfibrille spielen die durch Cystein/Cystin anwesenden SH- bzw. SS-Gruppen, die zu 70% in der Histonfraktion F3 vorhanden sind. Durch diese Arbeit sollte geklärt werden, ob im Zusammenhang mit malignen Wachstumsprozessen das Verhältnis von DNA zu Cystein/Cystin konstant bleibt, oder ob sich möglicherweise durch die Verschiebung dieser Relation ein Hinweis auf eine Änderung der Chromatinfibrille bei der Entstehung des menschlichen Portiokarzinoms ergibt.

Als Material fanden Smears der menschlichen Portio uteri Verwendung. Nach enzymatischer Aufarbeitung und ent-

sprechender Färbung (Feulgen-Acriflavin für DNA und Alcianblau für Cystein/Cystin) wurden die Smears im Hinblick auf den DNA- bzw. Cystein-/Cystin-Gehalt cytophotometrisch ausgewertet. Die Einzelwerte wurden in Histogrammen aufgetragen und einer statistischen Analyse unterzogen. Bei allen drei Versuchsgruppen (Kontrolle, Carcinoma in situ und invasives Carcinom) ergaben sich, sowohl bei den Mittelwerten als auch bei den Standardabweichungen der Histogramme, übereinstimmende Ergebnisse.

Aufgrund der Ergebnisse dieser semiquantitativen Meßreihe muß davon ausgegangen werden, daß sich die Cystein-/Cystin-Werte in einer analogen Art und Weise verhalten wie die DNA-Werte. Da die DNA-Histon-Relation und auch die DNA-Cystein-/Cystin-Relation bei der Karzinogenese der menschlichen Portio uteri erhalten bleibt, kann man annehmen, daß sich die Grundstruktur der Chromationfibrille auch im Verlauf der Karzinomentstehung nicht ändert.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS,C.; SLOPER,J.: The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog. J. Endocrin. 13, 221-228 (1956)
- ALEXANDER,P.; HUDSON,R.; FOX,M.: The reaction of oxydizing agents with wool. Biochem. J. 46, 27 (1950)
- ALLFREY,V.: Fuctional an metabolic aspects of DNA-associated proteins. In: PHILLIPS,D. (Hrsg.): Histones and Nucleohistones Plenum Publishing Corporation New York, 241-294 (1971)
- AXEL,R.; MELCHIOR,W.; SOLLNER-WEBB,B.; FELSENFELD,G.: Specific sites of interaction between histones and DNA in chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci. 71/10, 4101 (1974)
- BAFUS,N.; ALBRIGHT,S.; TODD,R.; GARRARD,W.: A method for mapping the distributions of modified and variant histones among mono- and polynucleosomes. J. Biol. Chem. 253/8, 2568 (1978)
- BARNETT,R.; SELIGMAN,A.: Histochemical demonstration of sulphydryl and disulfide groups of protein. J. Nat. Cancer Inst. 14/4, 769 (1954)

- BLAZSEK,V.; BUKARESTI,L.: The study of cystein content of the chicken erythrocyte histon by polarography. *Experimentia* 20, 369 (1964)
- BÖHM,N.: Cytophotometrische Messungen des DNS-Gehaltes feulgengefärbter Mäuse-ascites-Tumorzellen in verschiedenen Stadien des Tumorwachstums bei Variation der Hydrolysezeit. Dissertation Gießen 1965
- BÖHM,N.; SANDRITTER,W.: Der Zellkern-DNS-Gehalt menschlicher Tumoren. *Med. Welt* 27/22, 1073 (1976)
- BÖHM,N.; SPRENGER,E.: Fluorescence cytophotometrie: A valuable method for the quantitative determination of nuklear Feulgen- DNA. *Histochemie* 16, 100 (1968)
- BÖHM,N.; SPRENGER,E.: "Nine-Position-Test" for proof of even illumination of the light field in fluorescence microspectrophotometry. *Histochemie* 22, 59 (1970)
- BOSELEY,P.; BRADBURY,E.; BUTLER-BROWNE,G.; CARPENTER,B.; STEPHENS,R.: Physical studies of chromatin. The recombination of histones with DNA. *Europ. J. Biochem.* 62, 21 (1976)
- BUDECKE,E.: *Grundriss der Biochemie*. Walter de Gruyter Verlag Berlin New York (1974)
- CASPERSSON,T.: Die quantitative Bestimmung von Thymonukleinsäure mittels fuchsinschwefliger Säure. *Biochem. Zsch.* 253, 97 (1932)

- CASPERSSON,T.: Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkernes. *Scand. Arch. Physiol.* 73/Suppl.8 (1936)
- CASPERSSON,T.; LOMAKKA,G.; CASPERSSON,O.: Quantitative cytochemical methods for the study of tumor cell populations. *Biochem. Pharmacol.* 4, 113 (1960)
- DEAKIN,H.; ORD,M.; STOCKEN,L.: Glucose-6-phosphate-dehydrogenase activity and thiol content of thymus nuclei from control and x-irradiated rats. *Biochem. J.* 89, 296 (1963)
- FAMBROUGH,D.; BONNER,J.: Sequence homology and role of cysteine in plant and animal arginine-rich histones. *J. Biol. Chem.* 243, 4434 (1968)
- FINCH,J.; LUTTER,L.; RHODES,D.; BROWN,R.; RUSHTON,B.; LEVITT,M.; KLUG,A.: Structure of nucleosome core particles of chromatin. *Nature* 269, 29 (1977)
- FRANKLIN,S.; ZWEIDLER,A.: Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature* 266, 273 (1977)
- FRENSTER,J.: Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of RNA. *Nature* 206, 680 (1965)
- GERMOND,J.; HIRT,B.; OUDET,P.; GROSS-BELLARD,M.; CHAMBON,P.: Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72/5, 1843 (1975)

- GOLDSTEIN,D.: Mechanism of differential staining of nucleic acid. Nature 191, 407 (1961)
- GRAUMANN,W.: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagenz. Z. Wiss. Mikr. 61, 225 (1953)
- GRUNDMANN,E.; STEIN,P.: Untersuchungen über die Kernstrukturen in normalen Geweben und im Carcinom. Beitr. path. Anat. 125/1, 54 (1961)
- HARMS,H.: Handbuch der Farbstoffe für die Mikroskopie. Staufen Verlag Kamp (1965)
- HERZOG,R.: Zur Bestimmung von Arginin im Zellkern des menschlichen Portioepithels. Arch. Gynäk. 217, 437 (1974)
- HERZOG,R.: Zur Zytochemie des Portiokarzinoms anhand zytophotometrischer und planimetrischer Untersuchungen. Beitr. Path. 161, 62 (1977)
- HESS,W.; SULLIVAN,M.: The cystin, cystein, and methionine content of proteins. J. Biol. Chem. 151, 635 (1943)
- HNILICA,L.: The structure and biological function of histones. ORC-Press Cleveland (1972)
- HOLLEMANN,A.; WIBERG,E.: Lehrbuch der anorganischen Chemie. Walter de Gruyter Verlag Berlin (1971)
- KARLSON,P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag Stuttgart (1974)

- KASTEN,F.: The chemistry of Schiff's reagent. Int. Rev. Cyt. 10, 100 (1960)
- KORNBERG,R.: Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Science 184, 868 (1974)
- KORNBERG,R.; THOMAS,J.: Chromatin structure: Oligomers of the histones. Science 184, 865 (1974)
- LANGE,W.: Zur selektiven färberischen Darstellung des Sammelrohrsystems in der Niere. Acta histochem. 25, 121 (1966)
- LEDERER,B.: Simultane quantitativ histochemische Darstellung von DNS, Histon, Gesamtprotein an normalen und Tumorzellen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 57, 453 (1966)
- LUCK,J.: Histone chemistry: The pioneers. In: BONNER,J.; TS'0,P. (Hrsg.): Nucleohistones. Holden Day San Francisco, 3 (1964)
- MARQUATDT,H.: Allgemeine Biologie des Chromosoms. In: Der Zellkern, red. v. ALTMANN,H., Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 97 (1971)
- MARSH,W.; ORD,M.; STOCKEN,L.: Thiol proteins in nuclei from rat liver and thymus. Biochem. J. 93, 539 (1964)
- MIRSKY,A.; RIS,H.: Variable and constant components of Chromosomes. Nature London 163, 666 (1949)

- NELSON,R.; YUNIS,J.: Species and tissue specificity of very lysine-rich and serine-rich histones. Exp. Cell. Res. 57, 311 (1969)
- NOLL,M.; THOMAS,J.; KORNBERG,R.: Preparation of native chromatin and damage caused by shearing. Science 187, 1203 (1975)
- ORD,M.; STOCKEN,L.: Variations in the phosphate content and thiol/disulfide ratio of histones during the cell cycle. Biochem. J. 107, 403 (1968)
- ORD,M.; STOCKEN,L.: Further studies on phosphorylation and the thiol/disulphide ratio of histones in growth and development. Biochem. J. 112, 81 (1969)
- PALLOTTA,D.; BERLOWITZ,L.; RODRIGUEZ,L.: Histones of genetically active and inactive chromatin in mealy bugs. Exp. Cell. Res. 60, 474 (1970)
- PANYIM,S.; CHALKLEY,R.: The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacralamide gels. Biochemistry 8/10, 3972 (1969)
- PANYIM,S.; SOMMER,K.; CHALKLEY,R.: Oxidation of the cysteine-containing Histone F3. Detection of an evolutionary mutation in a conservative histone. Biochemistry 10/21, 3911 (1971)
- PAPANICOLAOU,G.; TRAUT,H.: Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear. Zit. nach STOLL,P.; JAEGER,J.; DALLENBACH-HELLWEG,G.: Gynäkologische Zytologie. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York VIII (1968)

- PEARSE,E.: The histochemical demonstration of keratin by methods involving selective oxydation. Quart. J. Micr. Science 92/4, 393 (1951)
- PEARSE,E.: Histochemistry. Theoretical and applied. Band II London (1972)
- PHILLIPS,D.: Cysteine in calf-thymus histones. Biochem. J. 97, 669 (1965)
- RAUEN,H.: Biochemisches Taschenbuch Band I und II. Springer Verlag Berlin-Heidelberg-Göttingen (1964)
- REIFFENSTUHL,G.; SEVERIN,E.; DITTRICH,W.; GÖHDE,W.: Die Impulscytophotometrie des Vaginal- und Cervixsmears. Arch. Gynäk. 211, 595 (1971)
- RÖMPS CHEMIE-LEXIKON Hrsg. v. O. Neumüller Band I und II. Stuttgart (1972, 1974)
- ROMEIS,B.: Mikroskopische Technik. Oldenbourg Verlag München (1968)
- SADGOPAL,A.; BONNER,J.: Proteins of interphase and metaphase chromosomes compared. Biochem. Biophys. Acta 207, 227 (1970)
- SANDRITTER,W.: Methodik der Cytophotometrie im sichtbaren und ultravioletten Licht. Folia Morphologica XII (XX), 2 (1961)

- SANDRITTER,W.: DNA content of tumors - cytophotometric measurements. Europ. J. Cancer 1, 303 (1965)
- SANDRITTER,W.: Funktionsstrukturen des Zellkern Eu- und Heterochromatin . Med. Welt 21 (N. F.), 1 (1970)
- SANDRITTER,W.; FISCHER,R.: Der DNS-Gehalt des normalen Plattenepithels, des Carcinoma in situ und des invasiven Carcinoms der Portio. International Congress of Cytology, Proc. I. Int. Congr. Exfol. Cytol. 189 (1962)
- SANDRITTER,W.; JOBST,K.; RAKOW,L.; BOSSELMANN,K.: Zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. Histochemie 4, 420 (1965)
- SOLLNER-WEBB,B.; FELSENFELD,G.: Protein interaction with DNA in chromatin. Academic Press New York (1975)
- SPRENGER,E.; BÖHM,N.: Fluoreszenzcytophotometrische Bestimmung des Feulgen-DNS-Gehaltes einzelner Zellkerne. Zbl. allg. Path. 113, 253 (1970)
- STUTTE,H.; KIKUCHI,M.: Eine Methode zum Nachweis von hydrolytischen Enzymen mit sukzedaner zytophotometrischer Bestimmung von DNS, Histon und Gesamtprotein. Histochemie 17, 121 (1969)
- SWIFT,H.: The Desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei. Physiological Zoölogy, XXIII/3 (1950)

ULLMANN'S ENCYKLOPÄDIE der technischen Chemie. Band 13
München Berlin (1962)

VENDRELEY,R.; VENDRELEY,C.: La teneur du noyau cellulaire
en acide désoxyribonucléique à travers les organes,
les individus et les espèces animales. *Experienta*
4, 434 (1948)

VENDRELEY,R.; VENDRELEY,C.:La teneur du noyau cellulaire en
acide désoxyribonucléique à travers les organes,
les individus et les espèces animales. *Experienta*
5, 327 (1949)

VILLEGAS,E.; POMERANZ,Y.; SHELLENBERGER,J.: Colorimetric
determination of persulfate with alcianblue.
Anal. Chim. Acta 29, 145 (1963)

WIDSTÖM,G.: Über die Verwendbarkeit der Schiff'schen Fuchsin-schwef-
ligsäurereaktion zur quantitativen Bestimmung von
Thyminucleinsäure. *Bioche. Zsch.* 199, 298 (1928)

WIELAND,H.; SCHEUING,G.: Die Fuchsin-schweflige Säure und ihre
Farbreaktion mit Aldehyden. *Ber. dtsch. chem. Ges.*
54/10, 2527 (1921)

WILHELM,J.; SPELSBERG,T.; HNILICA,L.: Nuclear proteins in
genetic reconstruction. I Histones. *Sub. Cell.* 1, 39
(1971)

ZUBAY,G.; DOTY,P.: The isolation and properties of desoxyribo-
nucleoprotein particles containing single nucleic acid
molecules. *J. molec. Biol.* 1,1 (1959)

Dem Direktor der Universitätsfrauenklinik Mainz, Herrn Professor Dr. med. V. Friedberg, spreche ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation, die hilfreiche Unterstützung und die großzügigen Arbeitsbedingungen meinen aufrichtigen Dank aus.

Herrn Oberarzt Dr. med. R. Herzog danke ich vielmals für die außerordentlich gute Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie die wertvolle Unterstützung und Beratung, die mir jederzeit zuteil wurden.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. G. Rathgen für die freundliche Übernahme des Korreferates.

LEBENS LAUF

Am 30. März 1954 wurde ich, Annette Christine Queißer, als Tochter des selbständigen Kaufmanns Herbert Queißer und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Jobus in Mainz/Rhein geboren.

Von April 1960 bis 1964 besuchte ich die Mainzer Schillerschule und wechselte anschließend auf das Staatliche Frauenlobgymnasium in Mainz über. An diesem Gymnasium besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig und legte am 24. Mai 1973 die Reifeprüfung ab.

Mit dem Wintersemester 1973/74 immatrikulierte ich mich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz in der Fachrichtung Medizin. Hier legte ich am 26. März 1976 die ärztliche Vorprüfung und am 31. März 1977 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Zum Wintersemester 1977/78 wechselte ich an die medizinische Fakultät der Universität Wien über. Dort habe ich in Zusammenhang mit meiner Dissertation an Praktika und Vorlesungen des Krebsforschungsinstitutes teilgenommen. Nach einem Semester kehrte ich an die Johannes Gutenberg-Universität in Mainz zurück und legte am 28. März 1979 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab. Den dritten klinischen Ausbildungsabschnitt (Praktisches Jahr) absolvierte ich von April 1979 bis April 1980 am Städtischen Krankenhaus Kemperhof in Koblenz. Am 10. April 1980 bestand ich den schriftlichen und am 5. Mai 1980 den mündlichen Teil des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.

Am 1. August 1980 habe ich meine Weiterbildung zum Facharzt für Kinderheilkunde an der Universitätskinderklinik Mainz begonnen.

Mainz, den 1. Oktober 1980

Annette C. Queißer

